

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut  
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
Lehrstuhl: Bakteriologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarische Leitung:  
Prof. Dr. Rainer Haas

**„Charakterisierung von Einflussfaktoren  
auf die Suppression der *in vitro* Zytokin-Antwort  
durch uropathogene *Escherichia coli*“**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Christian Karl Meyer

aus  
Landshut

Jahr  
2015

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Rainer Haas

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2016

*... den Menschen, die mir wichtig sind!*





## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	- 5 -
Abkürzungsverzeichnis .....	- 10 -
1. Einleitung .....	- 15 -
1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	- 15 -
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> – Ein Überblick .....	- 15 -
1.1.2. Pathogene <i>E. coli</i> .....	- 16 -
1.2. Virulenzfaktoren uropathogener <i>E. coli</i> .....	- 19 -
1.2.1. UPEC-Adhäsine .....	- 20 -
1.2.2. Eisenversorgung .....	- 21 -
1.2.3. Sezernierte und membranständige Toxine .....	- 22 -
1.2.4. Beweglichkeit .....	- 23 -
1.2.5. Außenmembranvesikel .....	- 24 -
1.2.6. Bildung von Kapseln .....	- 24 -
1.2.7. Biofilme und Intrazelluläres Wachstum .....	- 25 -
1.3. Das bakterielle Lipopolysaccharid – ein bedeutender Virulenzfaktor .....	- 25 -
1.3.1. Struktur des UPEC-Lipopolysaccharids .....	- 26 -
1.3.2. Biologische Aktivität des Lipopolysaccharids .....	- 28 -
1.4. Uropathogene <i>E. coli</i> und das Immunsystem .....	- 31 -
1.4.1. Erkennung und Bekämpfung uropathogener <i>E. coli</i> durch den Wirt .....	- 31 -
1.4.3. Immunevasionsstrategien uropathogener <i>E. coli</i> .....	- 33 -
1.5. Ziele dieser Studie .....	- 34 -
2. Material .....	- 36 -
2.1. Bakterienstämme .....	- 36 -

2.2. Eukaryotische Zelllinien .....	- 36 -
2.3. Medien und Platten zur bakteriellen Kultivierung .....	- 37 -
2.3.1. Medien.....	- 37 -
2.3.2. Agar .....	- 38 -
2.4. Antibiotika.....	- 39 -
2.5. Medien und Reagenzien für die eukaryotische Zellkultur .....	- 39 -
2.6. Enzyme, Puffer, Chemikalien und Sequenzierungen.....	- 40 -
2.7 Plasmide .....	- 41 -
2.8. Oligonukleotide .....	- 42 -
2.9. DNA und Protein Standard .....	- 44 -
2.10. Bioinformatische und Statistische Analysen .....	- 45 -
2.11. Technische Ausstattung.....	- 45 -
3. Methoden.....	- 48 -
3.1. DNA Arbeiten .....	- 48 -
3.1.1. genomische DNA .....	- 48 -
3.1.2. Plasmid Präparation.....	- 48 -
3.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	- 48 -
3.1.4. DNA Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung.....	- 51 -
3.1.5. Größenauftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese.....	- 51 -
3.1.6. Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarose Gelen .....	- 51 -
3.1.7. Enzymatischer DNA Verdau, Dephosphorylierung und Ligation .....	- 52 -
3.1.8. Herstellung von Plasmiden zur genetischen Komplementation.....	- 52 -
3.1.9. DNA Sequenz Analyse und Vergleich.....	- 53 -
3.2. Arbeiten mit Bakterien .....	- 54 -
3.2.1. Kultivierung von Bakterien .....	- 54 -
3.2.2. Transformation von Bakterienzellen .....	- 54 -

3.2.3. Inaktivierung bakterieller Gene .....	- 55 -
3.2.4. Analyse der Kapsel.....	- 56 -
3.2.5 Analyse der Biofilmbildung .....	- 57 -
3.3. Arbeiten mit Lipopolysacchariden .....	- 57 -
3.3.1. Isolation und Aufreinigung von Lipopolysacchariden .....	- 57 -
3.3.2. Quantifizierung mittels Purpald Reagenz .....	- 59 -
3.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung .....	- 59 -
3.4. Außenmembranvesikel (OMV).....	- 61 -
3.4.1. Isolierung von Außenmembranvesikeln.....	- 61 -
3.4.2. Quantifizierung der OMV Konzentration .....	- 62 -
3.5. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	- 63 -
3.5.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien .....	- 63 -
3.5.2. <i>In vitro</i> Infektionen.....	- 64 -
3.5.3. Ermittlung der Bakterienzahl im Infektionsversuch .....	- 66 -
3.5.4. Zell-Überlebens-Versuche.....	- 66 -
3.5.5. Gentamicin Protektionsversuche.....	- 67 -
3.6. Zytokin ELISA .....	- 68 -
3.7. Biolog Analysen .....	- 68 -
4. Ergebnisse .....	- 70 -
4.1. Uropathogene <i>Escherichia coli</i> -Stämme modulieren die <i>in vitro</i> Immunantwort .....	- 70 -
4.1.1. Reduzierte TNF- $\alpha$ -Immunantwort gegenüber Stamm UTI89 im Vergleich zu <i>E. coli</i> K12 .....	- 70 -
4.1.2. Hohe infektiöse Dosis für eine Modulation der Immunantwort nötig .....	- 72 -
4.1.3. Modulation der Immunantwort bei Vorstimulation der Makrophagen mit LPS.....	- 73 -
4.2. Knockout der Gene <i>galU</i> und <i>purL</i> im UPEC-Stamm UTI89 .....	- 74 -
4.2.1. Beeinflussung der Zytokin-Ausschüttung durch UTI89 $\Delta$ <i>purL</i> .....	- 75 -

4.2.2 Einfluss von UTI89 $\Delta galU$ auf die Zytokin-Antwort im Infektionsmodell .....	- 77 -
4.3. Charakterisierung der UTI89 $\Delta purL$ Mutante .....	- 79 -
4.3.1. Quantifizierung der Biofilmbildung.....	- 79 -
4.3.2. Überprüfung der Kapselbildung.....	- 80 -
4.3.3. Struktur-Analyse des Lipopolysaccharids.....	- 82 -
4.3.4. Analyse der Zytotoxizität der UTI89 $\Delta purL$ -Mutante .....	- 84 -
4.3.5. Biolog <sup>TM</sup> -Analysen des Kohlenstoffmetabolismus .....	- 85 -
4.3.6. Erstellung einer weiteren Purinstoffwechselmutante .....	- 87 -
4.3.7. Bestimmung der Zellzahlen von UTI89 $\Delta purL$ im Infektionsmodell .....	- 90 -
4.3.8. Vermindertes Wachstum der UTI89 $\Delta purL$ -Mutante .....	- 91 -
4.4. Analyse der UTI89 $\Delta galU$ -Mutante.....	- 95 -
4.4.1. Charakterisierung der Zytotoxizität der UTI89 $\Delta galU$ -Mutante.....	- 95 -
4.4.2. Vergleich der bakteriellen Überlebensraten im Infektionsmodell .....	- 96 -
4.4.3. Analyse der Kapsel von UTI89 $\Delta galU$ .....	- 97 -
4.4.4. Analyse der Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen mittels Biolog <sup>TM</sup> - Untersuchungen.....	- 98 -
4.4.5. Veränderungen in der Lipopolysaccharid-Struktur von UTI89 $\Delta galU$ .....	- 100 -
4.4.6. Herstellung verschiedener Lipopolysaccharid-Mutanten.....	- 101 -
4.4.7. Untersuchung der Biofilmbildung.....	- 106 -
4.4.8. Analyse des intrazellulären Vorkommens.....	- 107 -
4.4.9. Stimulation der Makrophagen mit isoliertem Lipopolysaccharid.....	- 108 -
4.4.10. Makrophagen Stimulation mit steril filtriertem Kulturüberstand .....	- 112 -
4.4.11. Versuche mit Außenmembranvesikeln .....	- 113 -
4.4.12. Co-Inkubation der Makrophagen mit inaktivierten Bakterien .....	- 115 -
5. Diskussion .....	- 118 -
5.1. UTI89 verringert aktiv die Immunantwort von Makrophagen.....	- 119 -

5.2. Die Gene <i>purL</i> und <i>galU</i> verhindern Immunmodulation durch UTI89 .....	- 120 -
5.3. Purin-Stoffwechseldefizit verhindert Wachstum / Immunmodulation im Makrophagen- Infektionsmodell.....	- 121 -
5.4. LPS-Strukturänderung sind maßgeblich am Verlust der Immunmodulation von UTI89 $\Delta$ <i>galU</i> beteiligt.....	- 123 -
5.5. LPS-Struktur nicht exklusiver Faktor der Immunmodulation.....	- 126 -
5.6. Schlussfolgerung .....	- 129 -
5.7. Ausblick .....	- 130 -
6. Zusammenfassung.....	- 132 -
7. Summary .....	- 134 -
8. Anhang .....	- 136 -
8.1. Plasmidkarten .....	- 136 -
8.2. Abbildungsverzeichnis .....	- 138 -
8.3. Tabellenverzeichnis.....	- 139 -
9. Literaturverzeichnis.....	- 140 -
Danksagung .....	- 154 -
Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Eidesstattliche Versicherung .....	- 156 -

## **Abkürzungsverzeichnis**

ad	Auffüllen auf
A/E	Anhaften und Auslöschen (engl.: „ <i>attaching-and-effacing</i> “)
AIR	5-Aminoimidazoribonukleotid
Ap	Ampicillin
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
APS	<b>A</b> mmonium <b>p</b> eroxodisulfat
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
BFP	„ <i>bundle-forming pili</i> “ Adhäsine
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
<i>cld</i>	<i>cld</i> Gen, kodiert für einen Regulator der O-PS Seitenkettenlänge
Cm	Chloramphenicol
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol Resistenz
CNF1	zytotoxische-nekrotisierende Faktor 1 (engl.: „ <i>cytotoxic-necrotizing factor 1</i> “)
DAEC	<b>D</b> iffus <b>a</b> dhärente <i>E. coli</i>
DMEM	<b>D</b> ulbecco's <b>M</b> odified <b>E</b> agle <b>M</b> edium
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: „ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<b>E</b> ntero <b>a</b> ggregative <i>E. coli</i>
EHEC	<b>E</b> ntero <b>h</b> ämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	<b>E</b> ntero <b>i</b> nvasive <i>E. coli</i>
ELISA	engl.: „ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> “
engl.	englisch
EPEC	<b>E</b> ntero <b>p</b> athogene <i>E. coli</i>
et al.	und andere (lat.: „ <i>et alii</i> “, „ <i>et aliae</i> “ oder „ <i>et alia</i> “)

ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
ExPEC	Extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
FACS	engl.: „ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “
FAK	fokale Adhäsionskinase
FBS	Fötales Kälberserum (engl.: „ <i>fetal bovine serum</i> “)
FGAM	N-Formylglycinamidin-Ribonucleotid
FGAMS	Phosphoribosylformylglycinamid Synthase
FGAR	N-Formylglycinamid-Ribonucleotid
for	Vorwärtsprimer (engl.: „ <i>forward primer</i> “)
FRT	engl.: „ <i>flippase recognition target</i> “
g	Gramm
GalU	UTP-Glucose-1-Phosphat Uridyltransferase
<i>galU</i>	<i>galU</i> Gen, kodiert für GalU
h	Stunde (lat.: „ <i>hora</i> “)
HEP	L-glycero-D-manno Heptose
HlyA	$\alpha$ -Hämolysin
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: „ <i>horseradish peroxidase</i> “)
HUS	Hämolytisch-urämische Syndrom
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Destilliertes Wasser
HWI	Harnwegsinfektion
I $\kappa$ B- $\alpha$ .	(engl.: „ <i>nuclear factor of <b>kappa</b> light polypeptide gene enhancer in <b>B</b>-cells inhibitor, alpha</i> “)
IPEC	intestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IBC	intrazelluläre bakterielle Gemeinschaften (engl.: „ <i>intracellular bacterial communities</i> “)
Kat. #	Katalognummer
KBE	Koloniebildende Einheit
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kdo	2-Keto-3-Desoxy-Octonat
kg	Kilogramm

## Abkürzungsverzeichnis

---

Kn	Kanamycin
Kn <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
KO	Knockout
kV	Kilovolt
l	Liter
lat.	Lateinisch
<i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> Gen des Lactose Operon
LB	engl.: „ <i>lysogeny broth</i> “
LBP	LPS-Bindeprotein
ln	Logarithmus naturalis
LPS	Lipopolysaccharid
LT	hitzelabiles Enterotoxin (engl.: „ <i>heat-labile enterotoxin</i> “)
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
mM	millimolar
MOI	Multiplizität der Infektion (engl.: „ <i>multiplicity of infection</i> “)
mS	Millisekunde
MyD88	engl.: „ <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i> “
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
NCBI	National Center for <b>B</b> io <b>te</b> chnology <b>I</b> nformation
NF-κB	engl.: „ <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> “
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD <sub>600nm</sub>	Optische Dichte bei 600nm Wellenlänge
OmpA	Außenmembranprotein A
OMV	Außenmembranvesikel (engl.: „ <i>outer membrane vesicle</i> “)



## Abkürzungsverzeichnis

---

ORF	Offener Leserahmen (engl.: „ <i>open reading frame</i> “)
ori	Replikationsursprung (engl.: „ <i>origin of replication</i> “)
p	Plasmid
PAI	<b>P</b> athogenitäts <b>i</b> nseln
PAGE	<b>P</b> olyacrylamid <b>G</b> elelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: „ <i>phosphate-buffered saline</i> “)
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (engl.: „ <i>pathogen-associated molecular patterns</i> “)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „ <i>polymerase chain reaction</i> “)
PurL	Phosphoribosylformylglycinamid Synthase
<i>purL</i>	<i>purL</i> Gen, kodiert für PurL
PurM	Phosphoribosylaminoimidazole Synthetase
<i>purM</i>	<i>purM</i> Gen, kodiert für PurM
P/S	<b>P</b> enicillin/ <b>S</b> treptomycin
rev	Rückwärtsprimer (engl.: „ <i>reverse primer</i> “)
RLU	Relative Licht Einheiten (engl.: „ <i>relative light units</i> “)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: „ <i>rounds per minute</i> “)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
SAT	sekretierter Autotransporter
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: „ <i>sodium dodecyl sulfat</i> “)
s.o.	siehe oben
ST	hitze stabiles Enterotoxin (engl.: „ <i>heat-stable enterotoxin</i> “)
STX	Shiga Toxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TcpC	TIR-Domänen-beinhaltenes-Protein- <i>coli</i> (engl.: „ <i>TIR domain containing protein coli</i> “)
TIR	TOLL/IL1-Rezeptor
TIRAP	engl.: „ <i>TIR domain containing adapter protein</i> “

## Abkürzungsverzeichnis

---

TLR	Toll-like Rezeptor
TMED	<b>T</b> etramethylethylendi <b>a</b> min
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRAM	engl.: „ <b>TRIF</b> -related <b>a</b> daptor <b>m</b> olecule“
TRIF	engl.: „ <b>TIR</b> -domain-containing adapter-inducing <i>interferon-<math>\beta</math></i> “)
u	Enzymeinheit (engl.: „ <b>u</b> nit“)
u.a.	unter anderem
UTI	Harnwegsinfektion (engl.: „ <b>u</b> rinary <i>t</i> ract <i>i</i> nfection“)
UPEC	<b>U</b> ropathogene <i>E</i> scherichia <i>c</i> oli
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vf	Virulenzfaktor
v/v	Volumen zu Volumen
WaaG	LPS $\alpha$ 1,3-Glycosyltransferase
<i>waaG</i>	<i>waaG</i> Gen, kodiert für WaaG
WaaL	O-Antigen Ligase
<i>waaL</i>	<i>waaL</i> Gen, kodiert für WaaL
w/v	Gewicht zu Volumen (engl.: „ <b>w</b> eight / <b>v</b> olume“)
Z!	Zentrifugationsschritt

## **1. Einleitung**

### **1.1. *Escherichia coli***

#### **1.1.2. *Escherichia coli* – Ein Überblick**

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist einer der bekanntesten und meist studierten Mikroorganismen. Das Bakterium wurde von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich (1857 – 1911) entdeckt und beschrieben (Escherich, 1885). Abhängig von seiner genetischen Ausstattung kann es sowohl ein nützlicher Kommensale, aber auch ein schädlicher Krankheitserreger sein. Weiterhin gilt *E. coli* als das „Haustier“ der Genetiker, so dass die Erforschung des Bakteriums maßgeblich zur Entwicklung der modernen Molekularbiologie beitrug. Bereits 1997 wurde das Genom des *E. coli*-Stamms MG1655 komplett sequenziert, was der Forschung zusätzlichen Vorschub leistete (Blattner et al., 1997). Es überrascht daher wenig, dass zahlreiche namenhafte Forscher, wie etwa Joshua Lederberg, François Jacob oder Jacques Monod für ihre bahnbrechenden Arbeiten an der Genetik von *E. coli* mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden.

Das Bakterium *E. coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, wobei es auch kokkoide Formen annehmen kann (Krogfelt et al., 1993). *E. coli*-Serotypen werden durch ein modifiziertes Kaufmann-Schema entsprechend ihrer O- (O-Polysaccharid), H- (Flagellen) und K- (Kapsel) Oberflächen-Antigene klassifiziert (Kauffmann, 1946). *E. coli*-Genome besitzen in der Regel eine Größe zwischen 4,6 und 5,6 Megabasen (Mb). Diese Varianz spiegelt auch die Bedeutung stammspezifischer, genetischer Faktoren für diese vielseitigen Bakterien wider (Ochman and Bergthorsson, 1998). Die meisten *E. coli*-Stämme kolonisieren den Darm von Menschen oder warmblütigen Tieren. Deshalb gilt das Bakterium auch als Fäkalindikator und wird zur Bestimmung der Trinkwassersicherheit verwendet, wobei hier zunehmend der Einsatz molekularbiologischer Techniken anstatt der klassischen Kultivierung diskutiert wird (Mendes and Domingues, 2015). Durch diese Assoziation zu warmblütigen Lebewesen wächst das Bakterium in der Regel optimal bei 37°C (Hoffman et al., 1966).

### **1.1.2. Pathogene *E. coli***

Das Coli-Bakterium besitzt für den Menschen durchaus nützlichen Eigenschaften, wie etwa die Synthese von Vitamin K (Bentley and Meganathan, 1982) oder auch dem Schutz des Verdauungstrakts vor Bewuchs durch andere pathogene Bakterien (Hudault et al., 2001). Wegen seiner positiven Eigenschaften finden *E. coli*-Präparate, insbesondere der Stamm Nissle 1917, der bereits während des Ersten Weltkrieges isoliert wurde, häufig Anwendung als Probiotikum (Mutaflor®) (Jacobi and Malfertheiner, 2011).

Neben seiner positiven Wirkung als kommensales Bakterium stellt *E. coli* aber auch einen sehr vielseitigen Krankheitserreger dar. Ein drastisches Beispiel hierfür war der Ausbruch des *E. coli* Stammes O104:H4 aus dem Jahr 2011, der in Deutschland viele stationäre Krankenhausaufenthalte verursachte und mehrere Todesopfer forderte (Bielaszewska et al., 2011). Für die Pathogenität von *E. coli* sind zahlreiche Pathogenitätsfaktoren von Bedeutung, die bei kommensalen *E. coli* in der Regel nicht vorhanden sind. Diese Pathogenitätsfaktoren liegen entweder episomal auf Plasmiden vor (Wijetunge et al., 2014), sind Bakteriophagen-kodiert (Bonanno et al., 2015) oder ins bakterielle Genom integriert, oft in Form so genannter Pathogenitätsinseln (PAIs). Verschiedene PAIs existieren in fast identischer Form bei mehreren Spezies der *Enterobacteriaceae*, was für eine Verbreitung durch horizontalen Gentransfer spricht (Dobrindt et al., 2010; Schubert et al., 1998). Pathogene *E. coli*-Stämme verursachen vor allem drei unterschiedliche klinische Symptome: (i) Infektionen des Gastrointestinaltrakts, (ii) Infektionen des Harntrakts und (iii) Meningitis bei Neugeborenen, (iv) Wundinfektionen und (v) Sepsis. Man unterscheidet dabei zwischen intestinal pathogenen *E. coli* (IPEC) und extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC).

#### **1.1.2.1. Intestinal pathogene *E. coli***

Intestinal pathogene *E. coli* (IPEC) sind in weitere Subgruppen unterteilt, abhängig von ihren exprimierten Pathogenitätsfaktoren und dem klinischen Bild, das diese Bakterien verursachen. So ruft etwa eine Infektion mit enterotoxischen *E. coli* (ETEC) wässrige Diarrhoe bei Kleinkindern in Entwicklungsländern und bei Reisenden (Reisediarrhoe) hervor. ETECs heften sich mit Hilfe ihrer Adhäsine an Darmzellen und geben dort entweder das hitzelabile Enterotoxin LT (engl.: *heat-labile enterotoxin*), das hitzestabile Enterotoxin ST (engl.: *heat-stable enterotoxin*) oder

beide Toxine ab. Durch die Wirkung der Toxine kommt es zu einer massiven Sekretion von Elektrolyten ins Darmlumen, gefolgt von einem starken Flüssigkeitsverlust, was die Diarrhoe verursacht (Kaper et al., 2004; Nataro and Kaper, 1998).

Im Gegensatz dazu ist bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC) der so genannte „*attaching-and-effacing*“ (Anhaften und Auslöschen; A/E) pathologische Befund charakteristisch. Dieser führt zu morphologischen Deformationen der Darmmukosa. Diese Deformationen gehen mit einem Verlust der Mikrovilli einher und sind die Folge einer Neuordnung der Aktin-Filamente in der eukaryotischen Zelle, die von den EPECs initiiert wird. Typische EPEC-Stämme besitzen auch das „*bundle-forming pili*“-Adhäsion (BFP), das für die erste Annäherung an die Darmzellen benötigen wird und daher mit deren Pathogenität klar assoziiert ist (Kaper et al., 2004; Spira et al., 2014). Weiterhin ist es für EPEC-Stämme kennzeichnend, dass sie keine Shiga-Toxine (STX) besitzen, welche die Epithelzellen durch die Induktion der Apoptose zerstören. Infektionen mit EPEC führen auch zu akuter, schwerer Diarrhoe, die in seltenen Fällen, trotz moderner Behandlungsmethoden, immer noch tödlich enden können (Cleary et al., 2004; Nataro and Kaper, 1998).

Die eingangs erwähnten enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) sind eine der häufigsten Ursachen von Lebensmittel assoziierten Infektionen. Sie können, wie EPEC, auch die pathologischen A/E-Deformationen der Darmmukosa hervorrufen, besitzen aber typischerweise weitere Toxine wie z.B. Stx1 und Stx2. Vor allem durch deren Wirkung sind EHEC die häufigsten Erreger, die das Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) verursachen. Das HUS ist durch Anämie, Thrombozytopenie und schwerem Nierenversagen gekennzeichnet und geht häufig mit schweren Komplikationen einher (Bolton and Aird, 1998; Kaper et al., 2004; Nataro and Kaper, 1998).

Weiterhin wird zwischen enteroaggregativen *E. coli* (EAEC), enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) und diffus adhärenenten *E. coli* (DAEC) unterschieden. EAEC, die zu akuten, aber auch chronisch rezidivierenden Durchfallerkrankungen führen, zeichnen sich durch Autoaggregation und einer erhöhten Mukussekretion aus. EIEC verursachen hauptsächlich Darmentzündungen mit blutig-schleimigem Diarrhoe. Sie ähneln genetisch und pathologisch den *Shigella* spp. und sind durch starke Zellinvasion, die Polymerisation zellulären Aktins und die interzelluläre Verbreitung in benachbarte Zellen charakterisiert. DAEC schließlich führen meist zu wässriger Diarrhoe (Kaper et al., 2004; Nataro and Kaper, 1998).

### 1.1.2.2. Extraintestinal pathogene *E. coli*

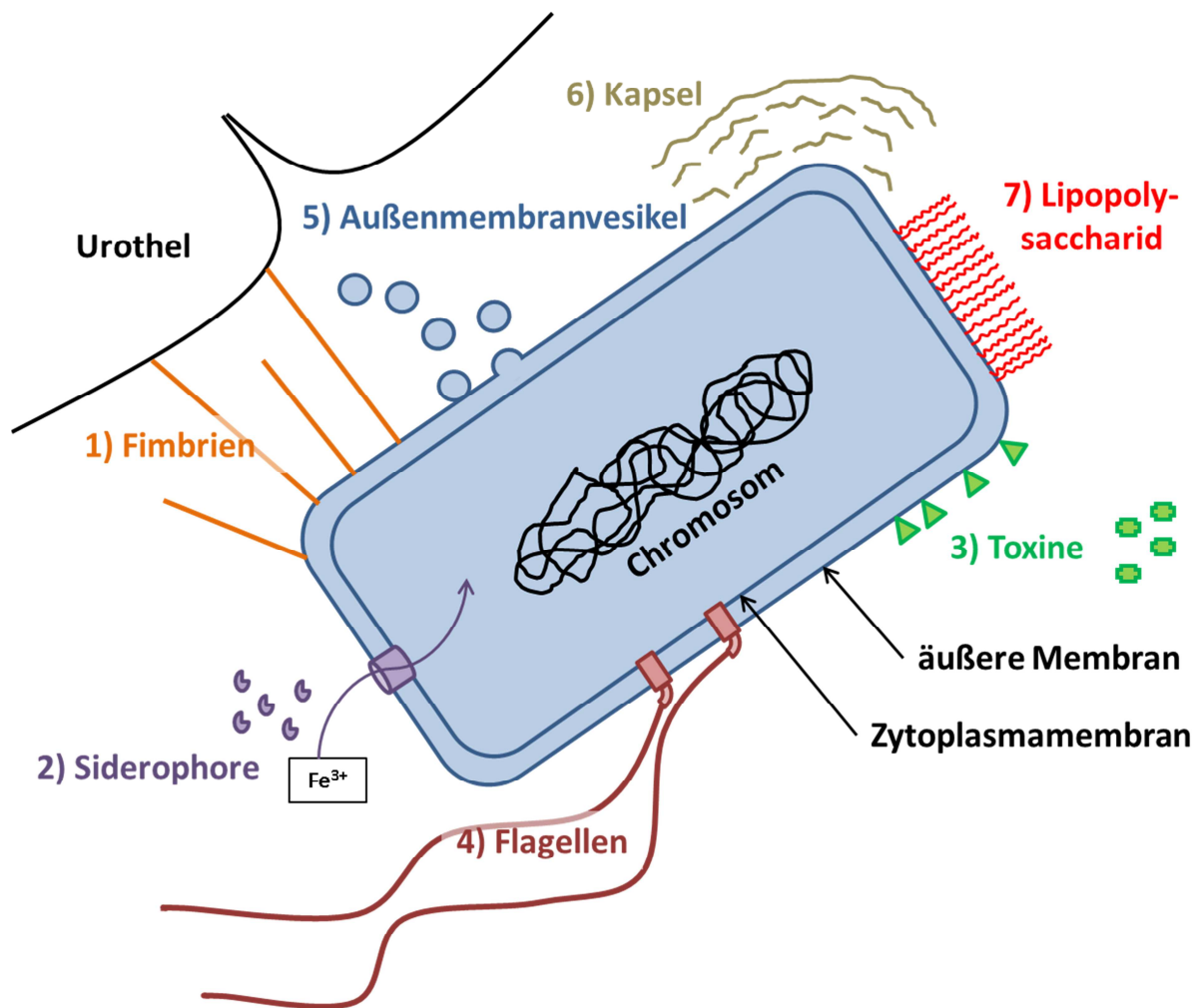
Harnwegsinfektionen (HWI) und Meningitis bei Neugeborenen sind die häufigsten von ExPEC verursachten Infektionen (Johnson and Russo, 2002). Bemerkenswert ist, dass über 80% der Meningitis-assoziierten ExPEC-Stämme eine Kapsel des Typs K1 bilden. Experimente mit Ratten zeigten, dass dieser Kapsel-Typ1 einen essentiellen Pathogenitätsfaktor darstellt (Kim et al., 1992). *E. coli*-K1 besitzen ein breites Spektrum an weiteren Virulenzfaktoren, beispielsweise das Außenmembranprotein A (OmpA) oder der zytotoxische-nekrotisierende Faktor (CNF1). Diese sind unter anderem involviert, wenn die Bakterien bei Erreichen einer ausreichend stark ausgeprägten Bakteriämie die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Kim, 2002).

HWIs gehören zu den häufigsten den Menschen betreffenden bakteriellen Erkrankungen. Daher führen sie auch zu erheblichen medizinischen und auch ökonomischen Belastungen. So ist etwa jede dritte Frau bis zum Alter von 24 Jahren mindestens einmal auf eine Antibiotika-Therapie als Folge eines HWI angewiesen (Foxman, 2003). Uropathogene *E. coli* (UPEC) sind der häufigste Erreger eines ambulant erworbenen HWI und für etwa 80% der Fälle verantwortlich (Ronald, 2002). HWIs werden nach ihrem Infektionsort in Zystitis (Blasenentzündung) und Pyelonephritis (Nierenbeckenentzündung) unterteilt (Foxman, 2003). Der Nachweis von Bakterien im normal, sterilen Urins ist eine Bakteriurie. Wenn damit keine klinische Symptomatik einhergeht, wird sie als asymptomatische Bakteriurie bezeichnet und bedarf meist keiner Behandlung. Eine Zystitis geht normalerweise mit den klassischen Symptomen eines HWI einher, wie Schmerzen beim Urinieren, sowie häufigen und plötzlichen Harndrang. Trotz der unangenehmen Symptomatik sind Blasenentzündungen für den Patienten meistens harmlos. Allerdings kann es ausgehend von einer Zystitis zu einer aufsteigenden Infektion, mit Beteiligung des Nierenbeckens, kommen. Diese Pyelonephritiden können dann zu irreversiblen Nierenschaden, Sepsis und auch zu akutem Nierenversagen mit Todesfolge führen (Bien et al., 2012).

Diese Arbeit widmet sich den genetischen und phänotypischen Eigenschaften von UPEC. Im Folgenden wird deshalb intensiv auf ihre Pathogenitätsfaktoren, die Erkennung durch das Immunsystem und ihre Immunevasionsstrategien eingegangen.

### **1.2. Virulenzfaktoren uropathogener *E. coli***

Die Besiedlung des Harntrakts stellt UPEC vor eine Vielzahl an Herausforderungen, die es zu überwinden gilt. Um diesen Schwierigkeiten durch beispielsweise den Harnfluss oder dem Immunsystem des Wirts zu begegnen, besitzen UPEC verschiedenste Pathogenitätsfaktoren (Abb. 1). Flagellen ermöglichen die Fortbewegung der Bakterien, während Adhäsine die Anheftung an das Uroepithel erlauben, um den ständigen Harnfluss Widerstand zu leisten. Durch Siderophore können sie um essentiell benötigtes Eisen gegen den Wirt bestehen. Weiterhin befähigen eine Vielzahl von Toxinen und anderen Faktoren, wie etwa die Bildung einer Kapsel, das Bakterium die Immunantwort des Wirts zu beeinflussen oder ihr zu entkommen. Zur Etablierung einer persistierenden Infektion bilden UPEC schließlich Biofilme oder sogar intrazelluläre Kolonien. Für eine erfolgreiche Infektion ist das Zusammenspiel und die zeitliche Taktung vieler Pathogenitätsfaktoren entscheidend (Dhakal et al., 2008).



**Abbildung 1: Schematische Übersicht relevanter UPEC-Pathogenitätsfaktoren**

Fimbrien (1; orange) ermöglichen die Adhäsion an das Urothel und Siderophorsysteme (2; lila) die Gewinnung von Eisen (Fe<sup>3+</sup>). Durch membranständige und sekretierte Toxine (3; grün) können Wirtszellen geschädigt werden. Flagellen (4; bordeaux) verleihen den Bakterien Beweglichkeit. Die Abschnürung von Außenmembranvesikeln (5; blau) ermöglichen Interaktionen mit ihrer Umgebung. Kapselbildung (6; dunkel grün) erfolgt unter anderem zum Schutz vor dem Immunsystem. Lipopolysaccharide (7; rot) fungieren u.a. als Endotoxin.

### 1.2.1. UPEC-Adhäsine

Adhäsive Moleküle zählen zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren uropathogener *E. coli*. Sie befähigen das Bakterium zur Anheftung an die Zellen des Harntrakts, damit die Erreger vom ständigen Harnfluss nicht weggespült werden. Erst dieser Mechanismus ermöglicht die Etablierung der Infektion. Die häufigsten, mit UPEC assoziierten, Adhäsion-vermittelnden



## 1. Einleitung

---

Strukturen sind Typ-1-, P-, S- und F1C-Pili ebenso wie Dr- und Afa-Adhäsine (Bien et al., 2012; Johnson, 1991)

Typ-1-Pili (Fimbrien), die sowohl bei pathogenen wie apathogenen *E. coli*-Stämmen weit verbreitet sind, werden vom *fim*-Operon kodiert. Trotz des gemeinsamen Vorkommens wurden Typ-1-Pili bei UPEC als ein wichtiger Faktor identifiziert, der Einfluss auf die bakterielle Besiedelung, die Invasion in die Wirtszellen und auch auf die Bildung von Biofilmen hat (Bahrani-Mougeot et al., 2002; Connell et al., 1996; Mulvey et al., 1998; Schembri and Klemm, 2001). An der Spitze des Typ-1-Pili sitzt das FimH-Adhäsine, welches bei UPEC an das Glykoprotein Uroplakin 1a bindet. Dieses befindet sich an der apikalen Oberfläche der Blase, was den UPEC-Tropismus erklärt (Zhou et al., 2001).

Die Expression von P-Pili (Fimbrien) wird durch das *papA-K*-Operon reguliert und oft bei pyelonephritischen UPEC-Isolaten beobachtet (Lane and Mobley, 2007). Das PapG-Adhäsine, von dem drei verschiedene Typen bekannt sind, befindet sich am distalen Ende des P-Pili. Diese binden an Globotriaosylceramid-Varianten, die sich vor allem auf der Oberfläche von Nierenzellen befinden, und daher für eine renale Infektion wichtig sind (Korhonen et al., 1986; Wiles et al., 2008).

Auch für F1C-Pili konnte eine Bindung an Blasen- und Nierenendothelzellen gezeigt werden, während von S-Pili angenommen wird, dass sie die Dissimilation im Wirt erleichtern. S-Pili kommen daher hauptsächlich bei Isolaten vor, die Sepsis, Meningitis und aufsteigende HWIs verursachen (Mulvey, 2002).

Weiterhin sind die fimbrialen Dr- und die afimbrialen Afa-Adhäsine in UPEC-Isolaten präsent. Dr-Adhäsine sind, nach Typ-1- und P-Fimbrien, der wahrscheinlich dritthäufigste Typ von Adhäsinen. Sie binden an das Dr<sup>a</sup>-Blutgruppenantigen und verdoppeln das Risiko für eine rezidivierende HWE. Auch von UPEC-Stämmen, die Afa-Adhäsine exprimieren, ist bekannt, dass sie besonders häufig rezidivierende oder chronische Infektionen verursachen (Bien et al., 2012; Nowicki et al., 2001).

### **1.2.2. Eisenversorgung**

Eisenionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) sind essentiell für das Wachstum der Bakterien. Sie benötigen dafür eine zytoplasmatische Eisenkonzentration von  $10^{-6}$  M (Andrews et al., 2003). Der Harntrakt ist

allerdings eine eisenarme Umgebung, so dass UPEC mehrere, funktional ähnliche Strategien entwickelt haben, um Eisen aufzunehmen (Barasch and Mori, 2004). Konsequenterweise wurden durch Transkriptomanalysen in UPEC eine stark erhöhte Expression von Eisenaufnahmesystemen, während einer Infektion des Harntrakts, festgestellt (Snyder et al., 2004). Zur Gewinnung von Eisen besitzen sie meist ein bis mehrere Siderophore, wie z.B. Enterobactin, Yersiniabactin oder Aerobactin. Siderophore sind sekretierte, eisenchelatisierende Moleküle von geringem Gewicht, die dem Bakterium ermöglichen, freies, wie auch wirtsgebundenes Eisen aufzunehmen. Durch spezielle Rezeptoren wie z.B. IroN für Salmochelin (Hantke et al., 2003) oder FyuA für Yersiniabactin (Hancock et al., 2008), werden die Siderophore mit dem daran gebundenen Eisen wieder vom Bakterium aufgenommen (Wiles et al., 2008).

Zusätzlich gibt es auch eine breite Palette von Siderophor-unabhängigen Systemen, wie etwa den ChuA-Rezeptor des Hemin-Aufnahmesystems (Torres and Payne, 1997). Interessanterweise wurde durch Genexpressionsanalysen herausgefunden, dass das *chuA*-Gen besonders stark bei intrazellulär wachsenden UPEC exprimiert wird und somit wohl besonders für die Eisengewinnung in der Wirtszelle von Bedeutung ist (Reigstad et al., 2007). Desweiteren kodiert *SitA* für Teile eines ABC-Eisentransportersystems, das in einer Studie in 15% der untersuchten UPEC-Isolate nachgewiesen werden konnte (Derakhshandeh et al., 2015). Daneben wurde erst kürzlich der Hemin-Rezeptor Hma im UPEC-Stamm CFT073 beschrieben, der sich im Mausmodell als wichtiger Faktor für eine Infektion der Nieren erwies (Hagan and Mobley, 2009).

### **1.2.3. Sezernierte und membranständige Toxine**

Das wahrscheinlich wichtigste Toxin bei UPEC ist  $\alpha$ -Hämolysin (HlyA), das bei bis zu 48% der untersuchten Isolate vorkommt (Marrs et al., 2002). HlyA ist ein 107 Kilodalton (kDa) großes, kalziumabhängiges Toxin, das einen Effektor für Typ I-Sekretionssysteme darstellt. Es bildet nach der Multimerisierung 2 nm große Poren in die Zellmembran, die, eine ausreichende HlyA-Konzentration vorausgesetzt, zur Lyse der Zielzelle führen (Ostolaza and Goni, 1995; Wiles et al., 2008). Weiterhin kann HlyA auch verschiedene zelluläre Prozesse beeinflussen. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass HlyA eine durch Caspase-1 und Caspase-4 induzierte Entzündungsreaktion in Urothelzellen einleiten kann, die in der Folge zum Zelltod führt

(Nagamatsu et al., 2015). Außerdem kann durch eine sublytische Konzentrationen an HlyA die Degradierung von Paxillin und weiterer zellulärer Faktoren induziert werden. Paxillin beeinflusst die Umgestaltung des Zytoskeletts und die fokale Adhäsion der Zelle, so dass dessen Abbau zu einer Exfoliation der Zielzelle oder auch einer Verschlechterung der Phagozytose-Fähigkeit führen kann (Dhakal and Mulvey, 2012). Obwohl es einerseits eine Verringerung der bakteriellen Last bedeutet, wird UPEC andererseits durch die Exfoliation und Zerstörung des Urothels, der Zugang zu tiefer liegenden Geweben freigegeben. Zusätzlich werden dringend benötigte Nährstoffe frei, die dem Bakterium die Besiedelung des Harntrakts erleichtern (Bower et al., 2005).

Ein weiteres wichtiges Toxin ist der zytotoxische-nekrotisierende Faktor 1 (CNF1), der bei etwa einem Drittel der untersuchten UPEC-Isolate vorhanden ist (Landraud et al., 2000). Das 113,7 kDa große Protein katalysiert eine permanente Aktivierung von Rho-GTPasen in der Zielzelle, die eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts auslöst (Lemonnier et al., 2007). Um seine toxische Wirkung zu entfalten, muss CNF1 ins Zytoplasma gelangen. Dazu bindet es an den Laminin-Rezeptor an der Zelloberfläche, wodurch CNF1, unabhängig von Clathrin, in endozytotische Vesikel aufgenommen und internalisiert wird. Die sauren Verhältnisse im Endosom ermöglichen es dann dem Toxin, seine katalytische Domäne ins Zytosol zu transferieren (Contamin et al., 2000). Während eines HWIs verursacht die Wirkung von CNF1 einen erhöhten Gewebeschaden, sowohl durch Entkoppelung der Urothelzellen als auch einer Erhöhung des Entzündungsschadens (Lemonnier et al., 2007).

Zusätzlich besitzen viele UPEC-Isolate das sekretierte Autotransporter-Toxin (SAT) und das vakuolisierende Autotransporter-Toxin (VAT), die ebenfalls zu Gewebeschäden führen (Wiles et al., 2008).

### **1.2.4. Beweglichkeit**

Die Infektion der Harnwege scheint eng an die Beweglichkeit der Bakterien gekoppelt zu sein, da 70 – 90% aller UPEC-Isolate Flagellen besitzen (Bien et al., 2012). Aufgrund der Distanzen, die bei einem aufsteigenden HWI überwunden werden müssen, sind Flagellen gerade für eine Besiedelung der Niere wichtig. Diese These wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass eine

## 1. Einleitung

---

Ausbreitung von UPEC in die Niere von Mäusen, mit Hilfe von Antikörpern gegen Flagellen, verhindert werden konnte (Schwan, 2008).

### **1.2.5. Außenmembranvesikel**

Gramnegative Bakterien können durch das Abschnüren von Teilen ihrer äußeren Membran sogenannte Außenmembranvesikel (*outer membrane vesicle*; OMV) produzieren. Diese OMVs sind kleine, sphärische Strukturen, die einen Durchmesser von 20 – 250 nm besitzen. Sie entsprechen in ihrer Zusammensetzung der äußeren Membran und enthalten zusätzlich noch Proteine des Periplasmas. Verschiedene biologische Funktionen wurden den OMVs bereits zugesprochen. So spielen sie etwa eine Rolle in der Pathogenität, dem Quorum Sensing und dem horizontalen Gentransfer bestimmter Stämme (Kulp and Kuehn, 2010). OMVs können auch Toxine an Zielzellen übermitteln. So werden zum Beispiel HlyA und CNF1 zum großen Teil durch OMVs ans Ziel gebracht (Balsalobre et al., 2006; Davis et al., 2006). Die effektive Quantifizierung von OMVs gestaltete sich bisher als schwierig. Da aber verlässliche OMV-Konzentrationen gerade für immunologische Studien essentiell sind, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine auf Durchflusszytometrie basierende, exakte Quantifizierungsmethode entwickelt (Wieser et al., 2014).

### **1.2.6. Bildung von Kapseln**

Kapselbildung ist für viele pathogene Bakterienstämme ein wichtiger Virulenzfaktor, um sich z.B. vor der Bindung von Komplementfaktoren oder Phagozytose zu schützen (Scholl et al., 2005; Van Dijk et al., 1979). Bei *E. coli* existieren eine große Bandbreite an Kapseltypen von mehr als 80 verschiedene K-Antigenen (Whitfield and Roberts, 1999). Meningitis verursachende ExPEC besitzen z.B. meistens das K1-Antigen, interessanterweise kommt es aber auch bei typischen, uropathogenen Isolaten, wie dem UTI89 oder dem NU14, vor (Wiles et al., 2008). Studien mit mehreren verschiedenen Arten von ExPEC zeigten, dass gerade K1-kapseltragende *E. coli*, deutlich häufiger als andere K-Typen, weitere Virulenzfaktoren besitzen, was für eine besondere Pathogenität dieser Stämme spricht (Ewers et al., 2007).

### **1.2.7. Biofilme und Intrazelluläres Wachstum**

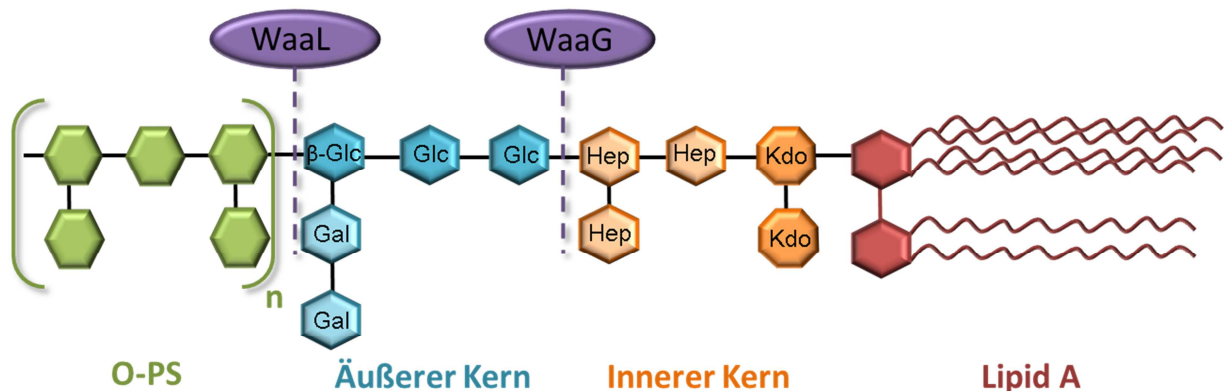
Die Bildung von Biofilmen führt bei UPEC dazu, dass sie sich an Oberflächen, beispielsweise einem Blasenkatheter festsetzen und so eine Infektion begünstigen. Auch die Invasion und Persistenz in Zellen des Wirtes sind auch für UPEC ein probates Mittel, um sich teilweise gegen die Immunantwort zu schützen. Durch intrazelluläre Lebensweise im Blasenepithel ist es UPEC sogar möglich, eine Behandlung durch bestimmte Antibiotika, wie etwa Mecillinam oder Gentamicin, für längere Zeit zu überstehen (Hvidberg et al., 2000; Kern et al., 2005). Die Invasion der Wirtszelle kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Am häufigsten wird der Eintritt durch das FimH-Adhäsın, an der Spitze der Typ-1-Pili, vermittelt. FimH bindet dazu an Zellstrukturen, wie etwa  $\alpha 3\beta 1$ -Integrine, wodurch eine Signalkaskade, mit Beteiligung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und der Phosphoinositid-3-Kinase, aktiviert wird. Diese Aktivierung resultiert dann in einer Neuordnung des zellulären Aktin-Zytoskeletts und einer Internalisierung der UPEC. Zusätzlich dazu kann eine Invasion der Wirtszellen auch durch andere Faktoren, wie etwa Afa- oder Dr-Adhäsinen, erfolgen (Dhakal et al., 2008; Eto et al., 2007; Martinez et al., 2000). Internalisierte UPEC persistieren anschließend im Zytoplasma der Zelle und bilden dort biofilmähnliche, intrazelluläre, bakterielle Gemeinschaften (IBC; engl.: „*intracellular bacterial communities*“), die etwa 6 bis 24 Stunden nach Infektion auftreten. In diesen IBCs liegen UPEC dichtgepackt in einer kokkoiden Form vor. Die IBC-Bildung führt einerseits zur vermehrten Abschuppung der infizierten Zellen, ist aber andererseits auch, bedingt durch die langwierige Persistenz der UPEC im Blasengewebe, ein Grund für wiederkehrende HWIs (Anderson et al., 2003; Berry et al., 2009).

### **1.3. Das bakterielle Lipopolysaccharid – ein bedeutender Virulenzfaktor**

Einen weiteren, sehr vielseitigen Virulenzfaktor stellt das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) dar, weswegen im Folgenden genauer auf dessen Struktur, die Synthese und die Rolle des LPS für die UPEC-Pathogenität eingegangen wird.

### 1.3.1. Struktur des UPEC-Lipopolysaccharids

Das LPS lässt sich strukturell in drei Abschnitte unterteilen: das Lipid A, den LPS-Kern (innerer und äußerer LPS-Kern) und das O-Polysaccharid (O-PS, auch O-Seitenkette oder O-Antigen) (Abb.2).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Zuckerstruktur des *E. coli* R1-LPS-Typs**

Das glatte LPS besteht aus repetitiven O-Polysaccharid- (O-PS) Elementen (*grün*), dem äußeren (*türkis*) und inneren (*orange*) LPS-Kern sowie dem Lipid A (*rot*). Die Zuckerkomposition des inneren Kerns besteht aus 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (Kdo) und Heptosen (Hep), die des äußeren Kerns aus Glucose (Glc), Galactose (Gal) und einem β-Glucose-Molekül (β-Glc). Der Syntheseschritt der O-PS-Ligase WaaL und der Glycosyltransferase WaaG (*lila*) ist jeweils durch eine gestrichelte Linie illustriert. Die Abbildung orientiert sich an Raetz und Whitfield (Raetz and Whitfield, 2002).

Das Lipid A ist durch Esterbindungen mit hydrophoben Fettsäuren verknüpft, welche für die Verankerung des LPS in die äußere Membran gramnegativer Bakterien verantwortlich sind. Außerdem stellt das Lipid A den endotoxisch aktiven Teil des LPS dar, wobei die Toxizität stark von dessen Struktur abhängt. So hat sich etwa das hexa-acylierte und diphosphorylierte *E. coli* Lipid A mit zwei β(1-6) gebundenen D-Glucosamin als besonders immunogen erwiesen (Erridge et al., 2002). *E. coli* ist, wie die meisten anderen gramnegativen Bakterien auch, ohne Lipid A nicht lebensfähig. Dies erklärt, warum es keine Mutanten der frühen Lipid A-Synthese gibt (Wyckoff et al., 1998). Als essentieller Bestandteil der Außenmembran des Bakteriums, ist das Lipid A auch wichtig für die Erhaltung einer effektiven Barriere zur bakteriellen Umwelt (Raetz and Whitfield, 2002).

Die Oligosaccharid-Struktur des LPS-Kerns ist bei verschiedenen Stämmen und Spezies in Teilen stark konserviert und lässt sich bei *E. coli* in fünf verschiedene Typen (R1 – R4 und K12)

einteilen (Rietschel et al., 1993). Interessanterweise ist der R1 Typ am häufigsten bei ExPEC-Stämmen, wie z.B. dem Stamm UTI89, vertreten. Das LPS-Kernoligosaccharid selbst kann nochmals in den inneren und den äußeren LPS-Kern unterteilt werden. Der innere LPS-Kern schließt an das Lipid A an und besteht charakteristisch aus ungewöhnlichen Zuckern, wie L-glycero-D-manno Heptose (Hep) und 2-Keto-3-Desoxy-Octonat (Kdo). Der äußere LPS-Kern ist dagegen mit dem O-PS verbunden und hauptsächlich aus gewöhnlichen Zuckern wie Hexosen und Hexosamine aufgebaut (Abb. 2). Die Synthese des LPS-Kerns ist schnell und effektiv, was die Vermutung nahe legt, dass die verantwortlichen Glykosyltransferasen als koordinierter Komplex arbeiten (Erridge et al., 2002; Raetz and Whitfield, 2002; Wang and Quinn, 2010). Alle Enzyme, die zur Synthese und Modifikation des LPS-Kerns benötigt werden, befinden sich als Synthese-Operons in der *waa* (früher *rfa*) Gen-Region auf dem bakteriellen Chromosom. Von besonderem Interesse sind dabei die O-PS-Ligase WaaL, da sie das O-PS mit dem LPS-Kern verknüpft, und die Glycosyltransferase WaaG, da sie den ersten Syntheseschritt des äußeren LPS-Kerns katalysiert (Abb. 2) (Heinrichs et al., 1998).

Das O-PS hat eine sehr variable Struktur, von der bereits über 160 Varianten bei *E. coli* bekannt sind. Sie unterscheiden sich in der Zuckerkomposition, den chemischen Verknüpfungen, der Bildung von Ringstrukturen und weiteren strukturellen Merkmalen. LPS-Varianten mit O-PS werden aufgrund der Morphologie ihrer Kolonieränder als glatt und Varianten ohne O-PS als rau bezeichnet. Die Anzahl der repetitiven Untereinheiten des O-PS kann, je nach Stamm, zwischen 1 und 50 schwanken. Weiterhin produziert ein einzelnes Bakterium O-PS verschiedener Länge, da die Synthese nicht immer vollständig ist. Diese O-PS-Längenvariation kann bei einer Größenauftrennung des LPS als charakteristische Leiterstruktur erkannt werden (Erridge et al., 2002). Das O-PS wird an der zytoplasmatischen Seite der inneren Membran synthetisiert, indem das membranständige Undecaprenylphosphat als Träger für die Untereinheiten fungiert. Sämtliche Enzyme, die für die Synthese der O-PS-spezifischen Zucker benötigt werden, ebenso die Glykosyltransferasen und Polymerasen, verantwortlich für den Aufbau der O-PS Untereinheiten, sind im *rfb*-Gen Cluster organisiert. Die O-PS-Polymere werden nach der Synthese, mit Hilfe von weiteren Genprodukten des *rfb*-Gen Cluster, durch die innere Membran transportiert. Auf der periplasmatischen Seite der Membran wird dann die O-PS-Kette durch die Enzyme Wzy und Wzz polymerisiert und anschließend durch WaaL an den LPS-Kern ligiert. Das im Entstehen begriffene LPS wird durch die Wirkung der Proteine LptA, LptB, LptC, LptF und LptG, durch das Periplasma, an die Innenseite der äußeren Membran transferiert. Abschließend

wird das LPS an die Außenseite dieser Membran, durch die Wirkung der Proteine LptD und LptE, befördert (Raetz and Whitfield, 2002; Wang and Quinn, 2010).

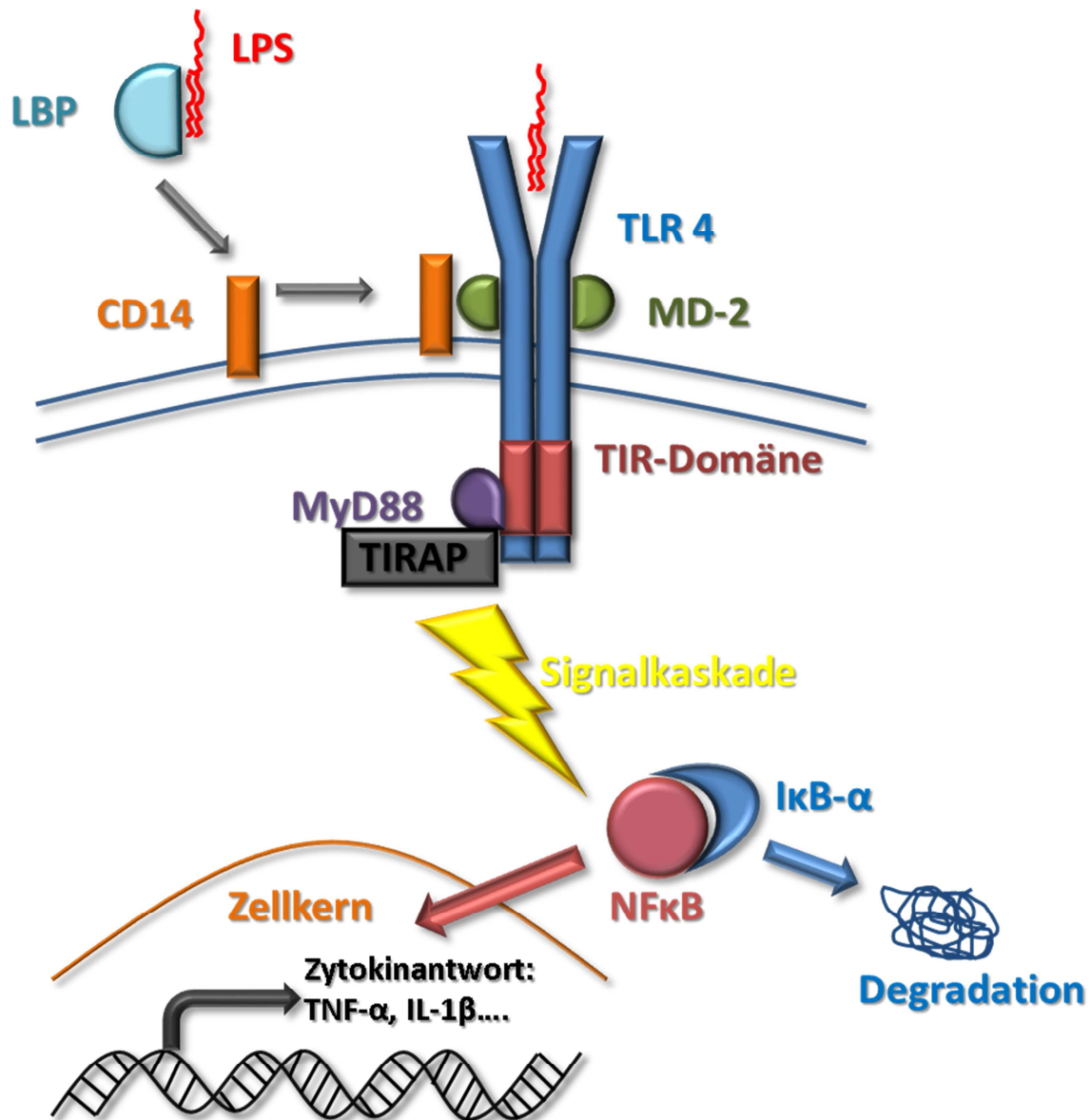
### **1.3.2. Biologische Aktivität des Lipopolysaccharids**

Die äußere Hülle von gramnegativen Bakterien besteht zu einem großen Teil aus LPS, das als essentieller Bestandteil für die Stabilität der Membran sorgt. Zusätzlich besitzt es auch eine wichtige Aufgabe im Schutz des Bakteriums vor hydrophoben Antikörpern, sowie vor der Aktivierung von Komplementfaktoren (Backhed et al., 2003). Eine weitere wichtige Funktion des LPS ist die Wirkung als Endotoxin. Der toxische Schock, der als Folge einer Bakteriämie zum Tod führen kann, wird beispielsweise durch eine akute entzündliche Reaktion gegenüber dem Lipid A verursacht. Diese Entzündungsreaktion wird zum großen Teil durch das Zytokin TNF- $\alpha$  vermittelt und ist auch maßgeblich von der Acylierung des Lipid A abhängig (Khan et al., 1998; Tracey et al., 1987). Penta-acyliertes Lipid A ist nicht nur deutlich weniger immunogen als hexa-acyliertes Lipid A, sondern kann sogar die proinflammatorische Immunantwort hemmen (Backhed et al., 2003). Der Acylierungsgrad des Lipid A nimmt entscheidenden Einfluss auf dessen 3D Struktur. So besitzt das immunogene, hexa-acylierte Lipid A eine konische Form, während penta-acyliertes Lipid A zylindrisch geformt ist und antagonistisch wirkt (Schromm et al., 2000).

Das LPS fungiert auch als ein sehr wichtiges Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (PAMP; engl.: „*Pathogen-associated molecular patterns*“), welches durch das Immunsystem des Wirtes, mit Hilfe von „Pattern-Recognition“-Rezeptoren erkannt wird. Im Fall von LPS ist es der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), der das Lipid A als PAMP bindet (Abb. 3). TLRs sind Typ I Transmembranproteine, die aus einer extrazellulären, einer transmembran und einer intrazellulären Region aufgebaut sind. Die extrazelluläre Region, die aus konservierten, leuzinreichen Domänen besteht, dient der Erkennung der PAMPs. Die intrazelluläre Region besitzt eine TOLL/IL1-Rezeptor-(TIR) Domäne, welche durch die Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle der Signalweiterleitung dient. Zur Erkennung wird LPS zuerst durch das LPS-Bindeprotein (LBP) gebunden und zum CD14 Protein weitergeleitet. Von dort wird das LPS weiter zum TLR4 transferiert, der in einem Komplex mit dem Protein MD-2 auf der Zelloberfläche vorliegt. Durch den Einbau von LPS kommt es zur Dimerisierung der TLR4-MD-2-Komplexe, wodurch sich deren TIR-Domänen im Inneren der Zelle annähern. Durch diese



räumliche Nähe der TIR-Domänen wird schließlich eine Möglichkeit zur Anlagerung weiterer Adaptormoleküle geschaffen (Erridge et al., 2002; Maeshima and Fernandez, 2013). Auf diese Aktivierung des TLR4-MD-2-Komplexes kann die Wirtszelle dann über verschiedene Signalkaskaden mit der Produktion von Zytokinen reagieren. So veranlasst die Rekrutierung der Adaptermoleküle MyD88 (engl.: „*myeloid differentiation primary response gene 88*“) und TIRAP (engl.: „*TIR domain containing adapter protein*“), über eine nachgeschaltete Signalkaskade, die Degradation von I $\kappa$ B- $\alpha$ . (engl.: „*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*“) Dessen Degradation führt dann zu einer Freisetzung von NF- $\kappa$ B (engl.: „*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*“) und einer Translokation in den Zellkern. Im Zellkern wird daraufhin die Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie etwa TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ , induziert. Zusätzlich ist die Produktion von IL-10 und von Typ I Interferonen über einen MyD88-unabhängigen Signalweg möglich. Dieser wird durch eine Interaktion der Adaptermoleküle TRIF (engl.: „*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$* “) und TRAM (engl.: „*TRIF-related adaptor molecule*“) mit der TIR-Domäne des TLR aktiviert (Brown et al., 2011; Maeshima and Fernandez, 2013). Interessanterweise besitzen Urothelzellen bei der Erkennung von LPS eine vergleichbar starke Sensitivität wie Makrophagen und sind dabei ebenso auf CD14 und TLR4 angewiesen, allerdings unterscheiden sie sich in der Komposition der ausgeschütteten Zytokine (Backhed et al., 2002).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der LPS Erkennung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch MyD88**

LPS (rot) wird durch das LPS-Bindeprotein LBP (hellblau) gebunden und zu CD14 (orange) weitergeleitet. CD14 transferiert das LPS zum TLR4 / MD-2 Komplex (blau/grün) der nach Bindung des LPS einen Dimer bildet. Durch die räumliche Nähe der TIR-Domänen (rot) des dimerisierten TLR4 können die Adaptermoleküle MyD88 (lila) und TIRAP (schwarz) binden und eine intrazelluläre Signalkaskade aktivieren. Diese führt zur Degradation von IκB-α (blau) und zur Freisetzung von NF-κB (rot) das in den Zellkern transloziert. Dort löst es eine Transkription der Gene für eine proinflammatorische Zytokin-Antwort aus.

Das LPS von *E. coli* verursacht neben einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems auch eine Antwort des erworbenen Immunsystems. So ist schon länger bekannt, dass *E. coli*-Stämme

erfolgreich durch Antikörper neutralisiert werden können. Diese Antikörper richten sich in der Regel gegen das O-PS des LPS und sind für einen O-Serotyp spezifisch (Davis et al., 1969; Tate, III et al., 1966), weshalb sie wenig für therapeutische Zwecke geeignet sind. Nach intensiven Studien wurde mittlerweile aber ein monoklonaler Antikörper beschrieben, der sowohl neutralisierend wirkt, als auch eine breite Kreuzreaktivität gegenüber vielen O-Serotypen besitzt (Muller-Loennies et al., 2007).

Zusätzlich interagiert LPS auch mit weiteren UPEC-Pathogenitätsfaktoren und ist für deren Wirkung von Bedeutung. So ist etwa die HlyA induzierte Kalziumoszillation von einer Interaktion mit einem durch LPS, LBP und CD14 gebildeten Komplex abhängig. Für die Zytolyse-Funktion des HlyA ist allerdings kein Zusammenspiel mit LPS nötig (Mansson et al., 2007).

### **1.4. Uropathogene *E. coli* und das Immunsystem**

UPEC kommen bei der Etablierung eines HWI mit den Abwehrmechanismen des Wirtes auf unterschiedliche Art und Weise in Kontakt. Einerseits gibt es Faktoren des Wirts, die eine Besiedelung der Harnwege generell erschweren, andererseits hält dessen Immunsystem verschiedene aktive Abwehrstrategien parat. Im Gegenzug dazu haben UPEC Strategien entwickelt, um die Immunantwort des Wirts zu unterdrücken oder zu umgehen.

#### **1.4.1. Erkennung und Bekämpfung uropathogener *E. coli* durch den Wirt**

Bei der Erkennung von UPEC durch den Wirt spielen TLRs eine gewichtige Rolle, insbesondere der bereits beschriebene, LPS-erkennende TLR4. So ist bereits seit längerem bekannt, dass Mäuse, die einen Defekt in der TIR-Domäne des TLR4 besitzen, deutlich anfälliger für HWIs sind, als Mäuse mit einem intakten Rezeptor (Poltorak et al., 1998; Svanborg et al., 1984). Weiterhin ist auch TLR5, der durch Flagellin aktiviert wird, an der Erkennung von UPEC beteiligt. Deshalb konnte auch in *Tlr5*<sup>-/-</sup> Mäusen, nach einer UPEC-Infektion, eine reduzierte Immunantwort und eine erhöhte bakterielle Last festgestellt werden (Andersen-Nissen et al., 2007). Bei weiteren Infektionsstudien mit Mäusen wurde festgestellt, dass TLR11 ein weiterer

wichtiger Rezeptor für die Erkennung von UPEC ist. Bei Menschen dürfte TLR11 allerdings keine Rolle spielen, da der offene Leserahmen (ORF; engl: „*open reading frame*“) des kodierende Gens ein Stopcodon beinhaltet (Zhang et al., 2004).

Durch eine HWI wird sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem aktiviert. Eine frühe Erkennung und Aktivierung der angeborenen Immunantwort scheint dabei eine besonders wichtige Rolle zu spielen (Anders and Patole, 2005). Dadurch kommt es zur Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Entscheidend ist dabei die Ausschüttung von IL-6 durch Blasenepithelzellen, das unter anderem eine Rekrutierung von Neutrophilen und eine Aktivierung und Differenzierung weiterer Immunzellen bewirkt (Schilling et al., 2003; Schilling et al., 2001). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch das proinflammatorische Zytokin IL-17A für die Rekrutierung von Immunzellen und die Transkription weiterer Zytokine wichtig ist (Sivick et al., 2010). Besonders die Einwanderung von Neutrophilen zum Infektionsort hat sich, sowohl in der Blase als auch in der Niere, als kritischer Faktor zur Beseitigung der Bakterien erwiesen (Haraoka et al., 1999). Das Zytokin TNF- $\alpha$  ist bei bakteriellen Infektionen an der Aktivierung von Mastzellen, der Einwanderung von Neutrophilen und der Beseitigung der Bakterien beteiligt (Malaviya et al., 1996). Wegen diesen Eigenschaften spielt TNF- $\alpha$  auch bei HWIs eine vielfältige Rolle. So wurde z.B. eine durch TNF- $\alpha$  vermittelte, entzündliche Reaktion in der Blase beobachtet, die eine Folge der Aktivierung von Mastzellen ist (Batler et al., 2002). Weiterhin konnte eine vermehrte Einwanderung einer Subgruppe von TNF- $\alpha$  produzierenden dendritischen Zellen zum Infektionsort als Folge einer UPEC Infektion festgestellt werden. Diese Zellen trugen aber nicht maßgeblich zur Beseitigung der Bakterien bei, weswegen ihnen eher eine Rolle in der adaptierten Immunantwort zugedacht wird (Engel et al., 2006).

Das Vorkommen spezifischer Antikörper im Urin von Patienten mit einem HWI (Pearsall and Sherris, 1966) und die Tatsache, dass 75% der Frauen, die bereits einen HWI durchlitten, von einer zweiten Infektion verschont bleiben, lässt auf eine Beteiligung der adaptierten Immunantwort gegenüber UPEC schließen (Thumbikat et al., 2006). So war es bereits möglich, Affen, durch eine Vakzinierung mit dem PapDG-Protein der UPEC-P-Pili, vor einer Pyelonephritis zu schützen (Roberts et al., 2004). Weiterhin konnte in Mäusen eine protektive, spezifische Antikörperantwort gegenüber UPEC erzielt werden, die Ovalbumin als Antigenmarker exprimieren (Thumbikat et al., 2006). Dies unterstreicht die Rolle der adaptiven Immunantwort beim Schutz vor Reinfektion.

Neben diesen gewöhnlichen Abwehrmaßnahmen gegenüber bakteriellen Infektionen gibt es noch weitere Verteidigungsstrategien, die eine UPEC-Infektion erschweren. So wurden etwa Abwehrstrategien entwickelt, die eine Besiedelung des Harntrakts durch UPEC im Voraus verhindern sollen. Wie bereits beschrieben, ist die Typ-1-Pili vermittelte Adhärenz ans Urothel ein wichtiger Pathogenitätsfaktor für eine UPEC-Besiedelung des Harntrakts. Interessanterweise konnte bei einem im Urin vorkommenden Protein, dem Tamm-Horsfall Protein, gezeigt werden, dass es spezifisch an Typ-1-Fimbrien von *E. coli* bindet und somit eine Bindung an den Zielrezeptor verhindert (Pak et al., 2001). Mäuse, denen dieses Protein fehlt, etablieren bereits bei einer niedrigen Infektionsdosis eine starke und lang anhaltende Infektion durch UPEC (Bates et al., 2004). Auch im Kampf um essentielles Eisen wurden Verteidigungsmechanismen gegen UPEC-Siderophore durch den Wirt etabliert. Das Protein Lipocalin 2 kann das Siderophor Enterobactin binden und somit der Eisengewinnung durch UPEC entziehen. Mausexperimente zeigen auch hier, dass Lipocalin 2 ein wichtiger Faktor ist, um eine systemische *E. coli*-Infektion zu kontrollieren (Flo et al., 2004).

### **1.4.3. Immunevasionsstrategien uropathogener *E. coli***

Um eine erfolgreiche Infektion der Harnwege zu etablieren und eine längere Persistenz zu erlangen, haben UPEC verschiedene Strategien entwickelt, um dem Immunsystem zu entkommen, oder es zu manipulieren. Wie bereits beschrieben, gewährleisten sowohl die Bildung einer Kapsel, als auch eine intrazelluläre Lebensweise Schutz vor Immunfaktoren, wie z.B. Antikörper oder Komplementfaktoren. Dies ermöglicht sogar die Möglichkeit, eine antibiotische Behandlung zu überstehen (siehe 1.2.6. und 1.2.7.).

Zusätzlich dazu ist bekannt, dass UPEC direkt Immunzellen manipulieren oder töten. Sie adhären dazu z.B. an natürliche Killerzellen und töten diese durch HlyA. Konsequenterweise reduzieren sie somit auch die Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , die bei diesem Zelltyp sehr hoch ist (Gur et al., 2013). UPEC können auch die hervorgerufene Zytokin-Antwort, im Vergleich zu apathogenen *E. coli*, reduzieren. So verursachen UPEC bei Blasenepithelzellen eine signifikant niedrigere IL-6 und IL-8 Zytokin-Antwort (Hilbert et al., 2008). Durch Mutationsstudien an UPEC konnten bereits einige Gene identifiziert werden, die einen immunsuppressiven Einfluss der Erreger auf Blasenepithelzellen vermitteln. Diese Gene waren entweder an der LPS-

Biosynthese (Gene: *rfa*, *rfb* und *waaL*) oder der Biosynthese von Aussenmembranproteinen (Gen: *surA*) beteiligt. Zusätzlich wurden auch eine Alanin-Racemase (Gen: *alr*) und eine Peptidoglycan-Permease (Gen: *ampG*) als Einflussfaktoren ausfindig gemacht (Billips et al., 2008; Hunstad et al., 2005).

Erst kürzlich konnte in UPEC eine Gruppe von Proteinen beschrieben werden, welche die MyD88-abhängige Signalkaskade blockieren. Diese „TIR-Domänen-beinhalten-Proteine“ (Tcp – bei *E. coli*: TcpC) genannten Proteine beinhalten Aminosäure-Motive, die homolog zur TIR-Domäne von TLRs sind und ihnen eine direkte Interaktion mit MyD88 erlauben. Das sekretierte TcpC ermöglicht es UPEC die über TLR2 und TLR4 vermittelte, MyD88-abhängige NFκB-Aktivierung zu verhindern. Dadurch kann etwa die TNF-Ausschüttung von Makrophagen erfolgreich unterbunden werden (Cirl et al., 2008). Das Gen *tcpC* befindet sich in einer genomischen PAI, der *serU*-Insel, und kommt bei etwa 30% Sepsis-verursachender und etwa 50% Pyelonephritis-verursachender *E. coli*-Stämme vor (Schubert et al., 2010).

### **1.5. Ziele dieser Studie**

Diese Arbeit befasst sich mit den immunmodulierenden Fähigkeiten von UPEC. Gerade auf die interessanten Fragen, wie es UPEC schaffen, die Immunantwort zu ihren Gunsten zu beeinflussen und welche Faktoren dafür wichtig sind, gibt es nur lückenhafte Antworten. Das Protein TcpC, mit dem es UPEC gelingt aktiv die Immunantwort zu unterdrücken, liefert bereits interessante Einblicke in die Interaktion zwischen UPEC und Wirt. Da aber zahlreiche UPEC-Stämme kein TcpC besitzen (Schubert et al., 2010), soll diese Arbeit insbesondere in deren Strategien zur Immunevasion tiefere Einblicke liefern.

Dafür wurde auf Ergebnisse einer Transposon-Mutagenese des UPEC-Stammes NU14 zurückgegriffen, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde (Christiane Hoffmann – nicht publizierte Daten). Bei dieser Studie wurde beobachtet, dass eine Transposon-Insertion in die beiden Gene *galU* und *purL* die UPEC-Immunmodulation verhindern kann. Diese Beobachtung soll in der vorliegenden Arbeit, primär bei einem weiteren UPEC-Stamm - dem Stamm UTI89 - verifiziert und anschließend weiter charakterisiert werden. Dafür sollen gerichtete Deletionsmutanten dieser beiden Gene im Stamm UTI89 erstellt und die Deletion komplementiert werden. Anschließend soll geklärt werden, welche phänotypischen

## 1. Einleitung

---

Besonderheiten diese Mutanten aufweisen und ob relevante Pathogenitätsfaktoren durch die Deletion betroffen sind. Schließlich sollen, auch durch die Erschaffung und den Vergleich weiterer Mutanten ähnlichen Phänotyps, Rückschlüsse auf den jeweils zugrunde liegenden Mechanismus der Immunmodulation, bzw. dessen Verlust, gezogen werden.

## **2. Material**

### **2.1. Bakterienstämme**

Alle in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Stämme sind in nachfolgender Tabelle 1. gelistet.

**Tabelle 1: Bakterielle Stämme**

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Relevante Eigenschaften</b>	<b>Referenz</b>
MG1655	<i>E. coli</i> K12, -, $\lambda$ -, ilvG, rfb-50 rph-1	(Blattner et al., 1997)
UTI89	Uropathogenes Isolat, O18:K1:H7,	(Mulvey et al., 2001)
NU14	Zystitis Isolat, B2, O18:K1:H7	(Johnson et al., 2001)
Top10	Laborstamm	Invitrogen
DH5 $\alpha$	Laborstamm	Invitrogen
UTI89 $\Delta galU$	Chromosomale Deletion des <i>galU</i> -Gens	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta waaL$	Chromosomale Deletion des <i>waaL</i> -Gens	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta waaG$	Chromosomale Deletion des <i>waaG</i> -Gens	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta purL$	Chromosomale Deletion des <i>purL</i> -Gens	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta purM$	Chromosomale Deletion des <i>purM</i> -Gens	Diese Arbeit
UTI89 $cld::cm$	Chromosomale Insertion einer Cm <sup>R</sup> Kasette in das <i>cld</i> -Gen	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta galU$ /pWKS30- <i>pgalU</i>	UTI89 $\Delta galU$ komplementiert mit <i>pgalU</i> in dem pWKS30 Plasmid	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta galU$ /pWKS30	UTI89 $\Delta galU$ mit pWKS30 Plasmid	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta purL$ /pMCL200- <i>ppurL</i>	UTI89 $\Delta purL$ komplementiert mit <i>ppurL</i> in dem pMCL200 Plasmid	Diese Arbeit
UTI89 $\Delta purL$ /pMCL200	UTI89 $\Delta purL$ mit pMCL200 Plasmid	Diese Arbeit

### **2.2. Eukaryotische Zelllinien**

Für *in vitro*-Infektionsexperimente wurden murine J774A.1 Makrophagen (ATCC TIB 67) verwendet (Ralph et al., 1976).



### **2.3. Medien und Platten zur bakteriellen Kultivierung**

Im Folgenden sind alle zur Anzucht von Bakterien verwendeten Medien und Agar aufgeführt. Diese wurden vor der Verwendung bei 121°C für 20 min autoklaviert.

#### **2.3.1. Medien**

LB Medium (engl.: „lysogeny broth“):

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; pH-Wert: 7,5

SOC Medium:

20 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
0,5 g	NaCl
10 ml	KCl-Lösung (250mM)

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; pH-Wert: 7,0

Müller-Hinton Medium:

21g                    Müller-Hinton-Bouillon (Oxoid, Kat. # CM0337)

ad 1 Liter H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; pH-Wert: 7,3

Zusammensetzung:

3,0 g/l	Rindfleischextrakt
17,5 g/l	Säurehydrolysat von Casein
1,5 g/l	Stärke

## 2. Material

---

### **2.3.2. Agar**

Zum Gießen der Platten wurde autoklavierter Agar durch Erhitzen auf 121°C verflüssigt. Nach Abkühlen auf < 50°C wurde nach Bedarf unter sterilen Bedingungen Antibiotika zugegeben. Anschließend wurden jeweils ca. 20 ml in eine sterile Petrischale (94 mm x 16 mm) gegossen und bis zur Erstarrung abgekühlt.

#### R2A Agar Platten:

18,1 g            R2A Agar (Roth; Kat. #CL01.1)

ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>; pH: 7,2 ± 0,2

#### Zusammensetzung:

0,5 g/l	Hefeextrakt
0,5 g/l	Proteasepepton
0,5 g/l	Caseinhydrolysat
0,5 g/l	Glucose
0,5 g/l	Stärke
0,3 g/l	Di-Kaliumhydrogenphosphat
0,024 g/l	Magnesiumsulfat
0,3 g/l	Natriumpyruvat
15 g/l	Agar

#### LB Agar Platten:

LB Medium + 1,5% Agar (w/v) (BD; Kat. #214030)

#### Blut Agar Platten:

LB Agar mit 5% (v/v) Schaf-Erythrozyten (BD; Kat. #254071)

### **2.4. Antibiotika**

Antibiotika, die der bakteriellen Selektion dienen, wurden den verwendeten Medien / Agar in der in Tabelle 2 aufgelisteten Konzentration zugesetzt. Alle verwendeten Stock-Lösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Angebrochene Stocklösungen wurden bis zur angegeben Maximaldauer bei 4°C aufbewahrt.

**Tabelle 2: Verwendete Antibiotika**

Antibiotika	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Kanamycin	50 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	50 µg/ml
Tetracyclin	5 mg/ml	70% EtOH	12 µg/ml
Streptomycin	30 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	30 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml	MeOH	30 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	100 µg/ml

### **2.5. Medien und Reagenzien für die eukaryotische Zellkultur**

Zum Kultivieren der eukaryotischen Zellen wurden folgende Medien und Reagenzien verwendet:

#### **RPMI 1640:**

PAN-Biotech; Kat. # P04-16500  
Mit 300 mg/l L-Glutamin  
Mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>

#### **DMEM:**

PAN-Biotech; Kat. # P04-01515  
Mit 1,0 g/l Glucose  
Mit 584 mg/l L-Glutamin  
Mit 110 mg/l Natriumpyruvat  
Mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>

#### **DPBS:**

PAN-Biotech; Kat. # P04-36500

## 2. Material

---

### Penicillin / Streptomycin (P/S):

PAN-Biotech; Kat. # P06-07100  
10.000 U/ml Penicillin  
10 mg/l Streptomycin

### Fötales Bovines Serum (FBS):

PAN-Biotech; Kat. # 1502-P102506

### Einfriermedium:

90% FBS  
10% DMEM (Dimethylsulfoxid)

## **2.6. Enzyme, Puffer, Chemikalien und Sequenzierungen**

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) und Thermo Fischer Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland) erworben.

Ligasen und Polymerasen wurden von den Firmen Thermo Fischer Scientific und MP Biomedicals Germany GmbH (Eschwege, Deutschland) bezogen.

Die benutzten Chemikalien stammten von den Firmen Carl-Roth (Karlsruhe; Deutschland), Merk, Oxoid und Sigma.

Folgende kommerziell zu erwerbende Labor-Kits wurden für diese Arbeit benutzt:

- Biolog<sup>TM</sup>-Platten PM1; Kat. # 12111 und PM2A; Kat. # 12112 (Biolog Inc., Hyward, Kalifornien, USA)
- Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay; Kat. # G7572 (Promega, Mannheim, Deutschland)
- Murine TNF- $\alpha$  ELISA Development; Kat. # 900-K54 (Peprotech, Hamburg, Deutschland)
- Nucleo Bond<sup>®</sup> PC 20; Kat. # 740571.100 (Macherey Nagel, Düren, Deutschland)
- QIAprep Spin Miniprep Kit; Kat. # 27106 (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- QIAquick PCR Purification Kit; Kat. # 28106 (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- QIAquick Gel Extraction Kit; Kat. # 28706 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

## 2. Material

---

- Taq DNA Core Kit; Kat. # EPTQK109 (MPbio, USA)
- Topo® XL PCR Cloning Kit; Kat. # 450008; (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Topo® TA Cloning® Kit; Kat. # 450030; (Invitrogen)
- Ultra Clean Gel Spin – DNA Extraction Kit; Kat. # 12400-250 (MO Bio, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Wellcogen™ *N. meningitidis* B/*E. coli* K1; # R30859502 (Remel/Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA)

Der Erfolg und die Richtigkeit aller durchgeführten Klonierungen wurden durch DNA-Sequenzierungen der erstellten Plasmide überprüft. Sämtliche dafür benötigten DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben.

Puffer:

### TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) 50x:

2 M	Tris
6% (v/v)	Essigsäure (99,7%)
50 mM	EDTA (pH 8,0)
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

### PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Salzlösung) 10x:

80 g	NaCl
2 g	KCl
17,8 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 2 H <sub>2</sub> O
2,4 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1 l	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
pH 7,4 mit HCl einstellen	

## **2.7 Plasmide**

Sämtliche Plasmide, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

## 2. Material

**Tabelle 3: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pKD46	<i>repA101</i> (ts), <i>araBp-gam-bet-exo</i> ( $\lambda$ -Red Rekombinase unter Kontrolle eines <i>araB</i> Promotors), Ap <sup>R</sup> ( <i>bla</i> )	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	oriRg, Ap <sup>R</sup> , <i>cat</i> -Gen (Cm <sup>R</sup> ) flankiert von FRT Sites	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	oriRg, Ap <sup>R</sup> , <i>npt</i> -Gen (Kn <sup>R</sup> ) flankiert von FRT Sites	(Datsenko and Wanner, 2000)
pCP20	Yeast Flp Rekombinase Gen (FLP, aka <i>exo</i> ) <i>ts-rep</i> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Datsenko and Wanner, 2000)
pWKS30	Ap <sup>R</sup> , f 1 ori, <i>lacZa</i> , pSC101 ori; M13 Primer Bindestellen	(Wang and Kushner, 1991)
pMCL200	Cm <sup>R</sup> , P15Aori, <i>lacZa</i>	(Nakano et al., 1995)
pCR <sup>TM</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	TA Klonierungsvektor	Invitrogen
pCR <sup>TM</sup> XL-TOPO <sup>®</sup>	TA Klonierungsvektor	Invitrogen
pCR4- <i>pgalU</i>	pCR4 mit dem <i>galU</i> -Gen aus UTI89 unter Kontrolle der nativen Promotorregion	Diese Arbeit
pCR XL- <i>ppurL</i>	pCR XL mit dem <i>purL</i> -Gen aus UTI89 unter Kontrolle der nativen Promotorregion	Diese Arbeit
pWKS30- <i>pgalU</i>	pWKS30 mit dem <i>galU</i> -Gen aus UTI89 unter Kontrolle der nativen Promotorregion	Diese Arbeit
pMCL200- <i>ppurL</i>	pMCL200 mit dem <i>purL</i> -Gen aus UTI89 unter Kontrolle der nativen Promotorregion	Diese Arbeit

### 2.8. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die als PCR-Primer für die Vervielfältigung von DNA verwendet wurden, stammten von der Firma Metabion (Planegg, Deutschland). Die Sequenzen und der Verwendungszweck sind in Tabelle 4 aufgeführt.

## 2. Material

**Tabelle 4: Oligonukleotide für PCR**

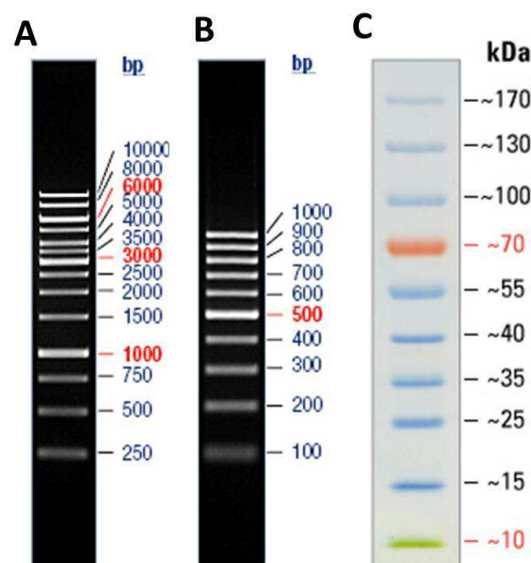
Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
<i>galU</i> .KO.for	ATGGCTGCCATTAATACGAAAGTCAAAAAAG CCGTTATCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>galU</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>galU</i> .KO.rev	TTACTTCTTAATGCCCATCTCTTCTTCAAGCC AGGCTTTACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>galU</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
pKDK1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Kontrolle Km <sup>R</sup> Insertion
pKD3.977	GCGCCTACCTGTGACGGAAGA	Kontrolle Cm <sup>R</sup> Insertion
M13.for	GTAAAACGACGGCCAG	Klonierungskontrolle
M13.rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Klonierungskontrolle
pMCL.1200.for	CAAGCTCGAAATTAACCCTCAC	Klonierungskontrolle pMCL200
pMCL.1376.rev	TGTAAAACGACGGCCAGTGAAT	Klonierungskontrolle pMCL200
<i>pgalU</i> .HindIII.for	TAGCAGAAGCTTGCAAACGATAACACGGGCT A	Klonierung von <i>pgalU</i>
<i>galU</i> .BamHI.rev	TGCATCGGATCCTTACTTCTTAATGCCCATCT	Klonierung von <i>pgalU</i>
<i>waaL</i> .KO.for	ATGTCGTTTTTGTGGAATGAAATTAACCTCTGG TGTCAAGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>waaL</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>waaL</i> .KO.rev	TTACTTATCTAATAAACATTGNGTCCGATTGT ACTTTAAAACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>waaL</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>waaG</i> .KO.for	ATGATCGTTGCTTTTTGTTTATATAAAATATTT TCCCTTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>waaG</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>waaG</i> .KO.rev	TCAACCATCCAGACCACCCGTTATGATGTCC GCCGCTTTCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>waaG</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>purL</i> .XhoI.for	GCATCTCGAGCAGGCCAAAAGGTTTCCCGT	Klonierung von <i>ppurL</i>
<i>purL</i> .XbaI.rev	CTAGTATCTAGATTACCCCAACTGCTTACGTG	Klonierung von <i>ppurL</i>
<i>ppurL</i> .sequenz.1306	GAAGTAGCCGTTCACTGC	Sequenzierung <i>purL</i> -Gen
<i>ppurL</i> .sequenz.2039	CGATGGTGATCCCTTCAC	Sequenzierung <i>purL</i> -Gen
<i>ppurL</i> .sequenz.2799	TCAGAGCGGTCGTGATAC	Sequenzierung <i>purL</i> -Gen
<i>ppurL</i> .sequenz.3556	CTGGCAACCGTTACATAC	Sequenzierung <i>purL</i> -Gen
<i>purM</i> .KO.for	AATCAAAGGCGTAGTGAAGAAAACGCGTCGT CCGGAAGTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>purM</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>purM</i> .KO.rev	TTATTTCGATAACCACGCGTTGTTTCGGAATCA GAGGTTTTGCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>purM</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
O18. <i>cld</i> .KO.for	TTATTTTCGCGTTGTAATTACGCAGCGCGTTAC GCCCAAGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	<i>Cld</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
O18. <i>cld</i> .KO.rev	ATGCGGACTTGGAATTTCCGTCAGTTAGGG TAATGATGACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>Cld</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase

## 2. Material

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
<i>purL</i> .KO.for	TTACCCCAACTGCTTACGTGCATTGCGGAAA ATGCGCATCGTGTAAGCTGGAGCTGCTTC	<i>purL</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>purL</i> .KO.rev	ATGATGGAAATTCTGCGTGGTTCGCCTGCATT GTCGGCACATATGAATATCCTCCTTAG	<i>purL</i> -Gen-Knockout mit $\lambda$ Red Rekombinase
<i>tcpC</i> .for	GGCAACAATATGTATAATATCCT	PCR Nachweis von TcpC
<i>tcpC</i> .rev	GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA	PCR Nachweis von TcpC

### 2.9. DNA und Protein Standard

Um die Länge von DNA Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese zu bestimmen, wurden die Generuler™ 1 kb und 100 bp DNA Ladder Längenstandards (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Zur Ermittlung der Größe von Proteinfragmenten und Zuckerresten mittels SDS-Gelelektrophorese, wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Größenstandard (Thermo Fischer Scientific) verwendet (Abb. 4).



**Abbildung 4: DNA und Protein Längenstandard**

Generuler™ 1kb DNA Ladder (A) und GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (B) mit den DNA Fragment Größen in Basenpaaren (bp). PageRuler™ Prestained Protein Ladder (C) mit der Größenangabe der Proteinfragmente in Kilodalton (kDa).



### **2.10. Bioinformatische und Statistische Analysen**

Die *in silico*-Planung der molekularbiologischen Arbeiten sowie das Alignment und die Verarbeitung der Sequenzierungsdaten erfolgte mit der Lasergene 8 Software von DNA-Star Inc. (Madison, Wisconsin, USA). Signifikante Unterschiede wurden anhand der Berechnung des *P*-Wertes mit dem Student's t-Test der SigmaStat 3.5. Software (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) bestimmt. Weiterhin wurde MS Office 10 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) für die Verarbeitung und graphische Darstellung der erhobenen Versuchsdaten verwendet. Alle verwendeten Programme sind in Tabelle 5 aufgelistet.

### **2.11. Technische Ausstattung**

Die verwendete technische Laborausstattung ist in der nachfolgenden Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5: Technische Ausstattung**

Gerätekategorie / Software	Gerätenamen und Hersteller
Autoklaven	Laboklav 160-MSLV
	VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 500EC
Bunsenbrenner	Gasprofi 2 <sup>SCS</sup> ; WLD Tec (Göttingen, Deutschland)
DNA Analyse Software	Lasergene 8; DNA-Star Inc. (Madison, Wisconsin, USA)
Elektrophorese Systeme	PerfectBlue Gelsystem Mini L; Peqlab (Erlangen, Deutschland)
	Mini-Protean II Electrophoresis System; Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA)
Elektroporator	Gene Pulser II; Bio-Rad
	Pulse Controller II; Bio-Rad
Datenverarbeitung	MS Office 10; Microsoft (Redmond, Washington, USA)
FACS	FACS Canto II; Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
FACS Auswertung	FlowJo 7.6.1.; Tree Star Inc. (San Carlos, Kalifornien, USA)
Foto Drucker	P93D; Mitsubishi (Minato, Japan)

## 2. Material

---

Gerätekategorie / Software	Gerätenamen und Hersteller
Gel Dokumentation	GDS 3.39; Intas (Göttingen, Deutschland)
French Press	SLM Aminco (Rochester, New York, USA)
Inkubatoren	Heraeus T12; Heraeus (Hanau, Deutschland) Cytoperm2; Heraeus Binder BT 115; Binder WTC (Tuttlingen, Deutschland)
Heizblock	Thermomixer comfort; Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Magnetrührer	RCT-basic; IKA-Werke (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Mikropipetten	Eppendorf Reference
Mikroskop	Axiovert 25 (Okular: 10x; Objektiv 10x und 20x); Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axioskop (Okular: 10x; Öl-Objektiv: 40x, 63x und 100x); Zeiss
Mikroplattenleser	Tristar LB 941; Berthold (Bad Wildbach, Deutschland)
Mikrowelle	M1712N; Samsung (Seoul, Südkorea)
NanoDrop	NanoDrop 2000; Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
PCR Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems (Thermo Fischer Scientific) Mastercycler gradient; Eppendorf
Photometer	Ultrospec 3100; Amersham Biosciences (General Electric; Fairfield, Connecticut, USA)
pH-Meter	PB-11; Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Schüttler	Thermomixer comfort; Eppendorf
Schüttelinkubatoren	Certomat R + Certomat H; Satorius Multitron; INFORS HT (Einsbach, Deutschland)
Speedvac	SC110; Savant (Holbrook, New York, USA)
Statistik Software	SigmaStat 3.5. (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland)
Sterilbank	HERA safe KS12; Thermo Electron Corporation (Thermo Fischer Scientific)
Stromversorger	Power Pac 200; Biorad Power Pac HC; Biorad

## 2. Material

---

Gerätekategorie / Software	Gerätenamen und Hersteller
Ultrazentrifuge	Optima L-90K Ultrazentrifuge Rotor: SW-32; Beckman Coulter (Pasadena, Kalifornien, USA)
UV Transilluminator	MG 21 x 26 UV; Intas
Vortex Tischschüttler	MS2 Minishaker (IKA)
Zentrifugen	5810R; Eppendorf 5417C; Eppendorf 5417R; Eppendorf 3K30; Sigma Sorvall Super T21, Thermo Electron Corporation

### **3. Methoden**

#### **3.1. DNA Arbeiten**

Im Folgenden werden alle DNA-basierten Methoden aufgeführt. Es wurden genetische Veränderungen von Bakterien, Kontrollen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung, sowie die Herstellung und Veränderung von Plasmiden durchgeführt.

##### **3.1.1. genomische DNA**

Um genomische DNA für Analysen und Vervielfältigung durch PCR über einen längeren Zeitraum zu konservieren, wurde eine Bakteriensuspension in sterilem PBS für 10 min auf 100°C gekocht und bei -20°C archiviert.

##### **3.1.2. Plasmid Präparation**

Die Plasmidisolation erfolgte aus über Nacht, bei 37°C (bzw. 30°C für Plasmid pKD46), in LB-Medien kultivierten *E. coli* Stämmen. Das hierfür verwendete Medium enthielt die jeweils entsprechenden Selektionsantibiotika. Um geringe Mengen an high-copy Plasmiden zu erhalten, wurde das „QIAprep Spin Miniprep“ Kit benutzt. Für low-copy Plasmide oder für eine größere Menge eines high-copy Plasmids, wurden AX20 Säulen aus dem „Nucleo Bond® PC 20“ Kit verwendet. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

##### **3.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt es mit Hilfe kurzer DNA-Primer und einer thermostabilen DNA-Polymerase gerichtet DNA-Fragmente exponentiell zu amplifizieren (Saiki et al., 1988). Diese DNA-Fragmente können dann ihrer Größe nach auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und visualisiert werden (siehe 3.1.5.). Die PCR-Methode wurde in dieser Arbeit für verschiedene

### 3. Methoden

---

Anwendungen benutzt. So wurde etwa durch eine gezielte Auswahl von PCR-Primern (i) die Existenz bestimmter Gene auf dem bakteriellen Chromosom oder (ii) das erfolgreiche Einbringen neuer DNA-Fragmente (z.B. Antibiotika Resistenz Gene) in das bakterielle Chromosom nachgewiesen. Weiterhin lassen sich durch den Einbau von Restriktionsschnittstellen in die Primer-Sequenzen PCR-Produkte erzeugen, die nach enzymatischem Verdau gezielt in Plasmide eingefügt wurden (siehe 3.1.8). Außerdem war es durch die von Datsenko und Wanner beschriebene Methode möglich, bakterielle Gene direkt mit PCR-Produkten auszuschalten (siehe 3.2.3.) (Datsenko and Wanner, 2000).

#### 3.1.3.1. Standard PCR:

Für Anwendungen, bei denen eine geringe Fehlerrate der PCR Reaktion nicht von Bedeutung war, wurde eine *Taq* Polymerase ohne Fehlerkorrektur Funktion verwendet. Dieser PCR Ansatz wurde daher hauptsächlich für Screening und Kontroll-PCRs verwendet. Die *Taq* Polymerase und die verwendeten Reagenzien stammten aus dem „Taq DNA Core Kit“ (MPbio).

#### Pro Ansatz – Taq Polymerase (25 µl):

Vorwärts Primer (20 µM)	0,5 µl
Rückwärts Primer (20 µM)	0,5 µl
10 x Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> Lösung (25 mM)	4 µl
10x dNTPs (jeweils 10mM)	1 µl
Template DNA	1,25 - 12,5 µg
<i>Taq</i> Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest	ad 25 µl

#### PCR Laufprotokoll:

1) Initiale Denaturierung	10 min	95°C
2) Denaturierung	45 s	95°C
3) Annealing (Standard)	45 s	58°C
4) Elongation	1 min / 1kb	72°C
5) Finale Elongation	10 min	72°C

Schritt 2 bis 4: 35 Wiederholungen.

### 3. Methoden

---

Die Annealing-Temperatur konnte bedingt durch Primer-Länge und Sequenz von der Standardtemperatur abweichen. Die Zeit des Elongationsschrittes richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments und betrug 1 min pro 1000 Basenpaare (bp).

#### 3.1.3.2. PCR mit Fehlerminimierung:

Polymerasen mit Fehlerkorrektur Funktion (= Proofreading-Polymerasen) wurden verwendet um fehlerfreie PCR Produkte für Sequenzierungen, Klonierungen oder genetische Knockouts zu erhalten. Dafür wurde entweder die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs; Kat. # M0530S) oder eine 1:1 Mischung der *Taq* (MPbio; s.o.) und der *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Fischer; Watham, Massachusetts, USA; Kat. # EP0572), verwendet.

##### Ansatz Phusion<sup>®</sup> (50 µl):

Vorwärts Primer (20 µM)	1,2 µl
Rückwärts Primer (20 µM)	1,2 µl
5 x Phusion HF Puffer	10 µl
DMSO	1 µl
10x dNTPs (jeweils 10mM)	1 µl
Template DNA	2,5 - 25 µg
Phusion <sup>®</sup> DNA Polymerase	0,5 µl
Aqua bidest	ad 50 µl

##### Ansatz Pfu Polymerase (50 µl):

Vorwärts Primer (20 µM)	1 µl
Rückwärts Primer (20 µM)	1 µl
10 x Puffer ohne MgCl <sub>2</sub>	5 µl
MgCl <sub>2</sub> Lösung (25 mM)	8 µl
10x dNTPs (jeweils 10mM)	2 µl
Template DNA	2,5 - 25 µg
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,2 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest	ad 50 µl

Das Laufprotokoll der fehlerminimierten PCR Läufe orientierte sich an der oben beschriebenen Standard PCR. Die Elongations-Zeit von PCR Läufen mit der Phusion<sup>®</sup> DNA Polymerase wurden mit 30 s Pro 1000 bp berechnet.

#### **3.1.4. DNA Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung**

PCR Produkte wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ laut Gebrauchsanweisung von Schmutz, Salzurückständen und ungebundenen Primern gereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei gibt das Verhältnis 260 nm zu 280 nm den Reinheitsgrad der Probe wieder. Ein Wert von ~ 1,8 gilt dabei als besonders reine DNA.

#### **3.1.5. Größenauftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in einem Agarosegel. Zur Herstellung der Agarosegele wurde TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA) mit 1,5% (w/v) Agarose vermischt und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose geschmolzen war. Nach Abkühlen auf unter 50°C wurde dem flüssigen Gel ca. 3% (v/v) Ethidiumbromid zugesetzt und das Agarosegel in eine vorbereitete Form gegossen. Anschließend wurde das ausgehärtete Gel in der Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer TAE bedeckt. Nun wurden die Proben mit 6x DNA „Loading Dye“ (Thermo Fischer Scientific) vermischt und in separate Geltaschen geladen. Zusätzlich wurde entweder der GeneRuler™ 100 bp oder 1 kb Längenstandard aufgetragen. Der Gellauf fand bei 120 V für 50 – 70 min, je nach Größe der Fragmente, statt. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden abschließend unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

#### **3.1.6. Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarose Gelen**

DNA-Banden wurden zur weiteren Verarbeitung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction“ Kits oder des „Ultra Clean Gel Spin – DNA Extraction“ Kits, nach Herstellerangaben, aufgereinigt.

#### **3.1.7. Enzymatischer DNA Verdau, Dephosphorylierung und Ligation**

Aufgereinigte PCR-Produkte und Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen in Kombination mit den empfohlenen Puffersystemen der Firmen Thermo Fischer Scientific und New England Biolabs enzymatisch verdaut. Der auf 50 µl berechnete Restriktionsansatz enthielt die in dH<sub>2</sub>O gelöste DNA, den Puffer in Arbeitsverdünnung und 1 U Enzym pro µg DNA. Der Ansatz wurde über Nacht, bei einer dem Restriktionsenzym entsprechenden, optimalen Temperatur, unter leichtem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Hitzeinaktivierbare Restriktionsenzyme wurden danach bei 65°C für 20 min inaktiviert.

Mit Restriktionsenzymen geschnittene Plasmide wurden mit Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP; Thermo Fischer Scientific) an den freien 5'-DNA-Enden dephosphoryliert, um eine spontane Wiederverbindung zu vermeiden. Die SAP wurde direkt nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen, in den Restriktionsansatz gegeben für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der SAP mittels Erhitzen fand abschließend bei 65°C für 15 min statt. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wurde zum Schluss durch Gelelektrophorese überprüft und die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert.

Der linearisierte und dephosphorylierte Vektor wurde nun mit der geschnittenen Insert-DNA durch eine T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) verbunden. Als optimal erwiesen sich Reaktionsansätze von 10 µl, die 5 U der T4 DNA-Ligase, T4 DNA-Ligase Puffer in 1x Konzentration, sowie Insert- und Vektor-DNA im Verhältnis von 3:1 enthielten.

#### **3.1.8. Herstellung von Plasmiden zur genetischen Komplementation**

Die beiden zur genetischen Komplementation verwendeten Plasmide pWKS30-*galU* und pMCL200-*ppurL* wurden in einem zweistufigen Klonierungsprozess erstellt. Zuerst wurde das gewünschte Gen durch PCR amplifiziert und in einen TOPO-Klonierungsvektor eingebracht. Um eine möglichst fehlerfreie PCR Reaktion zu gewährleisten, wurde das Gen zuerst mit einer Proofreading-Polymerase amplifiziert. Allerdings erstellen Proofreading Polymerasen keine Adenosin Überhänge am 3' Ende des PCR-Produkts, wie sie aber für eine TOPO-Klonierung benötigt werden. Deshalb wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und anschließend zur Erzeugung der Adenosin Überhänge eine verkürzte Standard PCR von nur drei Zyklen Dauer, mit einer *Taq*



### 3. Methoden

---

DNA-Polymerase durchgeführt. Im Anschluss wurde die TOPO-Klonierung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Kontrolle durch Sequenzierung, wurde das Zielgen mittels Restriktionsendonukleasen aus dem TOPO-Vektor geschnitten und in einen linearisierten *low-copy* Plasmid ligiert. Die Wahl des Vektors fiel dabei auf low-copy Plasmide (pWKS30 und pMCL200), da sie durch ihre niedrige zelluläre Kopienzahl eine möglichst native Komplementation ermöglichen.

Zur Herstellung des Plasmids pWKS30-*galU* wurde das *galU*-Gen und der native Promotor mit den Primern *galU.HindIII.for* und *galU.BamHI.rev* amplifiziert und wie beschrieben in den Vektor pCR<sup>TM</sup>4-TOPO<sup>®</sup> eingebracht. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primerpaar M13.for und M13.rev. Zur weiteren Klonierung wurde das *galU*-Gen mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem TOPO-Plasmid ausgeschnitten und in den, ebenfalls mit *EcoRI* linariisierten Vektor pWKS30 ligiert. Nach der Transformation von *E. coli* TOP10 mit dem Plasmid, konnte der Klonierungserfolg erneut durch PCR mit dem M13 Primerpaar kontrolliert werden.

Die Klonierung des *purL*-Gens, mit dem nativen Promotor, in das Plasmid pWKS30 erwies sich als problematisch, daher wurde das Plasmid pMCL200 als Klonierungsvektor verwendet. Nach Amplifizierung mit den Primern *purL.XhoI.for* und *purL.XbaI.rev* wurde das *ppurL* Zielgen zuerst in den Vektor pCR<sup>TM</sup> XL-TOPO<sup>®</sup> kloniert. Die Sequenzkontrolle erfolgte mit dem M13-Primerpaar sowie den Primern *ppurL.sequenz.1306*, *ppurL.sequenz.2039*, *ppurL.sequenz.2799* und *ppurL.sequenz.3556*. Anschließend wurde das *ppurL* Zielgen nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *XbaI* in den entsprechend linariisierten Vektor pMCL200 kloniert. Das weitere Vorgehen war analog zum oben Beschriebenen.

#### **3.1.9. DNA Sequenz Analyse und Vergleich**

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins durchgeführt und vor allem zur Erfolgskontrolle der Klonierungen benutzt. Dazu wurden Proben zu 15 µl Volumen entweder mit Plasmid DNA (50 – 100 ng/µl) oder aufgereinigtem PCR Produkt (bei 1000 bp: 10 ng/µl) und die gewünschten Sequenzierungs-Primer (10 µl; 5 µM) eingesandt. Die erhaltenen Sequenzen wurden danach mit der DNASTAR Lasergene 8 Software anhand der vollständigen UTI89 DNA Sequenz (Genebank: # CP000243.1; (Chen et al., 2006)) auf ihre Richtigkeit überprüft.

## **3.2. Arbeiten mit Bakterien**

### **3.2.1. Kultivierung von Bakterien**

Prokaryoten wurden standardmäßig bei 37°C in LB Flüssigmedium oder auf LB bzw. Blutplatten mit bei Bedarf zugegebenen Selektionsantibiotika kultiviert.

#### **3.2.1.1. Wachstumskurven**

Von allen verwendeten Bakterienstämmen wurden Wachstumskurven zur Ermittlung der Wachstumsrate und der dazu korrespondierenden Zahl koloniebildender Einheiten pro ml (KBE/ml) verwendet. Dazu wurde ausgehend von einer 1:50 (v/v) überimpften Übernachtskultur in Flüssigmedium mindestens stündlich die optische Dichte, bei einer Wellenlänge von 600nm ( $OD_{600nm}$ ), bestimmt. Weiterhin wurde bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 eine logarithmische Verdünnungsreihe erstellt und jede Verdünnungsstufe in Duplikaten auf LB Platten ausgebracht, die KBE ermittelt und die Zellzahl pro ml berechnet.

#### **3.2.1.2. Langzeitlagerung**

Zur Langzeitlagerung wurden Bakterienkulturen in 25% (v/v) Glycerin in dH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -80°C archiviert.

### **3.2.2. Transformation von Bakterienzellen**

Bakterienzellen wurden entweder durch die Elektroporation elektrokompenter Bakterien oder durch Hitzeschock chemisch kompetenter Bakterien transformiert.

#### **3.2.2.1. Transformation durch Elektroporation**

Durch Elektroporation wurde mit Hilfe eines elektrischen Schocks Plasmid- wie auch lineare DNA in elektrokompente Bakterien eingebracht. Um Bakterienzellen elektrokompent zu machen, wurden 50 ml Kultur bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,5-0,6 geerntet. Anschließend dreifach

### 3. Methoden

---

wiederholt mit 1 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin in dH<sub>2</sub>O gewaschen (Z! 10.000 rpm, 1 min, 4°C) und 10 sec mit dem Vortex-Tischschüttler durchmischt. Die elektrokompenten Bakterien wurden in 400 µl 10% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O aufkonzentriert und auf Eis zu je 50 µl aliquotiert.

Vor der Transformation musste die DNA aufgereinigt und durch 20 minütige Dialyse (Dialysefilter der Firma Millipore) über dH<sub>2</sub>O entsalzt werden. Ein Aliquot elektrokompente Bakterien wurde entweder mit 5 – 10 µl PCR Produkt oder 1 – 2 µl Plasmid-DNA vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und durch einen elektrischen Impuls transformiert (Widerstand 200 Ω, Ladung 25 µF, Spannung 1,8 kV, Puls 3,7 – 5,1 mS). Nach Aufnahme der Bakterien in 1 ml SOC-Medium (vorgewärmt auf 37°C), erfolgte eine einstündige Regenerationsphase bei 37°C. Zum Schluss fand die Selektion der Transformanten auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum statt.

#### **3.2.2.2. Transformation durch Hitzeschock**

Kommerziell erworbene, chemisch kompetente Expressions-Stämme (Top10, DH5α) wurden durch einen Hitzeschock von 90 sec bei 42°C transformiert. Die Transformation orientierte sich am Protokoll des Herstellers.

#### **3.2.3. Inaktivierung bakterieller Gene**

Die Inaktivierung bakterieller Gene (= Knockout) erfolgte nach der von Datsenko und Wanner beschriebenen Methode (Datsenko and Wanner, 2000). Diese Technik macht sich Eigenschaften der Red-Rekombinase des λ-Phagen zu Nutze, um chromosomale Gene durch homologe Rekombination mit einem PCR Produkt zu deletieren.

Für einen Knockout nach Datsenko und Wanner wurde zuerst ein Primer-Paar erstellt, das jeweils eine 40 nt lange, zum Anfang bzw. Ende des Zielgenes homologe Sequenz enthält. Weiterhin enthält jeder Primer auch eine 20 nt lange Sequenz, die flankierend zum Antibiotikaresistenz-Gen auf den Helfer-Plasmiden pKD3 bzw. pKD4 homolog ist. Das mit diesen Primern erstellte PCR Produkt enthielt somit je nach Plasmid-Template ein von FRT-Sites flankiertes Chloramphenicol Acetyltransferase Gen (Template: pKD3) oder ein Neomycin Phosphotransferase Gen (Template: pKD4). Weiterhin besitzt es sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende eine 40 bp lange, zum Zielgen

### 3. Methoden

---

homologe Region. Im weiteren Verlauf wurden nun Bakterien mit dem Plasmid pKD46, welches das  $\lambda$  Red Rekombinase Gen enthalten, transformiert. Die Expression der  $\lambda$  Red Rekombinase wurde durch Zugabe von Arabinose (10 mM) ins Kulturmedium der pKD46 enthaltenden Bakterien induziert. Transformation der induzierten Bakterien durch das aufgereinigte und entsalzte PCR Produkt fand ebenfalls durch Elektroporation statt. Die Rekombinase vermittelt einen Austausch des Zielgens durch die Antibiotikaresistenz-Kassette mittels Rekombination der homologen Regionen auf dem Bakteriengenom und dem eingebrachten PCR Produkt.

Die Selektion auf Klone mit inserierter Resistenzkassette geschah abschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum. Weiterhin wurde eine Kontroll-PCR mit dem Vorwärtsprimer des Knockoutprodukts und einem in der Resistenzkassette bindenden Rückwärtsprimer (pKDK1 für  $\text{Kn}^R$  und pKD3.977 für  $\text{Cm}^R$ ) durchgeführt, um auf eine korrekte Insertion zu überprüfen.

Als finaler Schritt wurde die integrierte Resistenzkassette mit Hilfe des Plasmids pCP20 eliminiert. Das Plasmid vermittelt eine thermisch induzierbare Synthese der FLP-Rekombinase. Nach Transformation des mutierten Bakterienstammes mit dem Plasmid pCP20 wird bei einer Inkubationstemperatur von 30°C die von FRT-Sites flankierte Resistenzkassette durch die exprimierte FLP-Rekombinase aus dem Chromosom herausgetrennt. Die Entfernung des thermosensitiven Plasmids aus dem Bakterium geschah im Anschluss durch Inkubation bei 42°C. Im Anschluss wurde die Eliminierung des Plasmids, ebenso wie der chromosomalen Resistenzkassette, durch negative Selektion auf LB-Platten mit Antibiotika überprüft.

#### **3.2.4. Analyse der Kapsel**

Die Färbung der bakteriellen Kapsel erfolgte durch ein Tuschepräparat (Breakwell et al., 2009), indem Bakterien von der Kulturplatte in einem Tropfen  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgenommen und 1:1 (v/v) mit Tusche verdünnt wurden. Nach dem Lufttrocknen des Präparats konnte die Kapsel bei mikroskopischer Betrachtung (Okular: 10x; Öl-Objektiv: 40x, 63x oder 100x), als ein heller, das Bakterium umgebender Hof erkannt werden. Zusätzlich konnten die Präparate mit Kristallviolett gegengefärbt werden. Die Kapsel war wieder als ein heller, das gefärbte Bakterium umgebender Hof zu erkennen.

### 3. Methoden

---

Mithilfe des Wellcogen<sup>TM</sup> Latex-Agglutinationstests können *E. coli*-Stämme auf die Ausprägung des K1 Kapsel-Antigens überprüft werden. Die Testlösung enthält Polystyrol-Latex-Partikel, die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind, welche das Polysaccharid *E. coli* K1-Antigen beziehungsweise das Antigen von *Neisseria meningitidis* Gruppe B binden. Wenn die getesteten Bakterienstämme das entsprechende Antigen besitzen kann auf dem Testkärtchen eine deutliche Agglutination beobachtet werden. Die Durchführung des Tests erfolgte mit Bakterienkolonien von Kulturplatten, wie vom Hersteller empfohlen.

#### **3.2.5 Analyse der Biofilmbildung**

Die Stärke der Biofilmbildung wurde durch vergleichende Kristallviolett-Färbungen in Mikrotiterplatten bestimmt (Djordjevic et al., 2002). Dazu wurde eine stationäre Übernachtskultur 1:100 verdünnt und in einer sterilen und transparenten 96-Well PVC Platte (Becton Dickinson) bei 37°C für 24 h inkubiert. Tags darauf wurde der Überstand abgenommen und das Well vorsichtig mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Platte 30 min in der Sterilwerkbank luftgetrocknet. Die Färbung des getrockneten Biofilms erfolgte danach mit einer 0,1% (w/v) Kristallviolett-Lösung für 15 min. Nach dem Verwerfen der Färbelösung folgte zweimaliges, vorsichtiges Waschen mit PBS. Zum Schluss wurde eine Methanol/Ethanol Mischung im Verhältnis von 4:1 (v/v) zugegeben und die OD<sub>590nm</sub> der Färbung im Multiplattenleser (Tristar LB941) bestimmt.

### **3.3. Arbeiten mit Lipopolysacchariden**

#### **3.3.1. Isolation und Aufreinigung von Lipopolysacchariden**

Lipopolysaccharide (LPS) wurden durch verschiedene Methoden aus lysierten Bakterien aufgereinigt. Hoch reine LPS-Präparate wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Otto Holst aus dem Forschungszentrum Borstel bezogen. In unserer Gruppe wurden reine LPS Präparate unter denaturierenden Bedingungen nach der von Kulesus et al. beschriebenen Methode isoliert (Kulesus et al., 2008). Zusätzlich wurde für diese Arbeit eine Methode etabliert, durch die man

LPS mit Hilfe einer ENDOTRAP<sup>®</sup> HD Säule (Hyglos GmbH, Deutschland) im unsauberen, dafür aber nativen Zustand extrahieren kann.

#### 3.3.1.1. Denaturierende LPS Aufreinigung

Für die reine, denaturierende LPS-Isolation wurde 1 ml einer 1,0 OD<sub>600nm</sub> Übernachtskultur pelletiert und in 250 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Im Anschluss wurden 250 µl Lysepuffer zugegeben und die Suspension 5 min bei 100°C gekocht. Nach Abkühlen auf RT wurde die Probe mit DNase (50 µg/ml) und RNase (500 µg/ml) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Daran schloss sich ein Proteinverdau mit Proteinase K (1,5 mg/ml) für 3 h bei 37°C an. Zum Schluss wurde die Suspension mit der Speedvac für ca. 3 h eingetrocknet und in 50 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### Lysepuffer:

1% (w/v)	Natrium Dodecyl Sulfat
50 mM	Tris HCl (pH 7,0)
10 mM	EDTA

#### 3.3.1.2. Native LPS-Aufreinigung

Da durch denaturierende LPS-Aufreinigung sämtliche Proteine verloren gehen, die potentiell an das LPS gebunden sind, wurde eine native LPS-Aufreinigung etabliert. Bei dieser Methode wurden die Bakterien zuerst mit einer French Press durch Druck lysiert und anschließend das LPS zusammen mit gebundenen Zellbestandteilen über eine ENDOTRAP<sup>®</sup> HD Affinitätssäule konzentriert. Für den Zellaufschluss wurden 50 ml einer Übernachtskultur pelletiert, in 10 mM Tris HCl (pH 7,5) aufgenommen und mind. 3 x durch die French Press mechanisch lysiert, bis eine sichtbare Aufhellung der Suspension stattfand. Nicht lysierte Bakterien und Zellreste wurden abzentrifugiert und verworfen, dann wurde der Überstand mit einem PVDF-Filter (Porengröße: 0,45 µm) steril filtriert und mit 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt. Nach Regeneration und Equilibrierung der ENDOTRAP<sup>®</sup>-Säule gemäß Herstellerangaben wurde das Lysat auf die Säule gegeben. Eine vollständige Elution des Durchflusses wurde durch die Zugabe von 1 ml Equilibrierungspuffer gesichert. Durch eine Zugabe von 3 ml Regenerationspuffer konnte schließlich das gebundene LPS von der Säule eluiert und diese für eine weitere Verwendung regeneriert werden.

#### **3.3.2. Quantifizierung mittels Purpald Reagenz**

Die LPS-Konzentration wurde mit Hilfe des Purpald<sup>®</sup>-Reagenz quantifiziert. Kurz zusammengefasst wurden jeweils 50 µl einer Verdünnungsreihe der LPS-Probe und eines LPS-Standards, zu Duplikaten, in einer transparenten 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu jedem Well wurden dann 50 µl einer 32 mM NaIO<sub>4</sub> Lösung zugefügt und für 25 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden jeweils 50 µl des 136 mM Purpald-Reagenz in 2 N NaOH zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Dem folgte eine Zugabe von 50 µl einer 64 mM NaIO<sub>4</sub> Lösung und eine Inkubation für 20 min bei RT. Final wurden 20 µl Isopropanol beigemischt, um die Suspension blasenfrei zu bekommen. Der entstandene Farbumschlag konnte dann bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden.

#### **3.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung**

Die Struktur des LPS wurde durch Gelelektrophorese auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung visualisiert.

##### **3.3.3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die LPS Auftrennung wurden auf 13,5% Acrylamidgelen durchgeführt, der Gellauf fand in Laemmli-Puffer bei 200 V für 60 min statt. Die Proben wurden für den Gellauf vorbereitet, indem sie 1:1 (v/v) mit Laemmli-Puffer und Ladepuffer in einfacher Endkonzentration versetzt und anschließend 10 min bei 100°C gekocht wurden (Lesse et al., 1990). Als Standard wurde der „PageRuler Prestained Protein Ladder“ verwendet (siehe 2.1.9.)

##### **Ladepuffer für SDS-Gele 4x:**

0,25 M	TrisHCl (pH 6,8)
0,4 M	β-Mercaptoethanol
8% (w/v)	SDS
40% (v/v)	Glycerol
0,4%	Bromophenol Blau

### 3. Methoden

---

#### Laemmli Puffer:

3,09 g	Tris
14,41 g	Glycin
1 g	SDS
ad 1 l dH <sub>2</sub> O	

#### Trenngel (13,5%):

1,69 ml	Acrylamid
1,4 ml	Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)
0,65 ml	dH <sub>2</sub> O
37,5 µl	SDS 10%
28,1 µl	APS 10%
2,4 µl	TEMED

#### Sammelgel:

0,32 ml	Acrylamid
0,47 ml	Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)
1,1 ml	dH <sub>2</sub> O
18,8 µl	SDS 10%
5,6 µl	APS 10%
4,6 µl	TEMED

#### **3.3.3.2. Silberfärbung**

Das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten LPS Proben wurde einer Silberfärbung unterzogen, da es sich hierbei um eine sensitivere Färbemethode als z.B. bei der Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau handelt (Hitchcock and Brown, 1983).

Dazu wurden die Gele zuerst über Nacht in Fixierer-Lösung bei 4°C gelagert. Tags darauf wurden die Gele dreimal 5 min lang gewaschen und anschließend für 30 min in Sensibilisierungslösung für die Färbung vorbereitet. Nach nochmaligem Waschen (dreimal 5 min) wurde das Gel mit frisch angesetzter Färbelösung für 20 min überschichtet. Im Anschluss an die Färbung wurde zweimal kurz mit dH<sub>2</sub>O und einmal kurz mit Entwickler gespült, danach wurde das Gel bis zur gewünschten Bandenintensität in Entwickler inkubiert. Der Entwicklungsprozess wurde durch Zugabe von Stopplösung abgebrochen und das fertig gefärbte Gel noch dreimal für 10 min gewaschen (Hitchcock and Brown, 1983; Tsai and Frasch, 1982).



### 3. Methoden

---

#### Fixier-Lösung:

30 ml	Eisessig
125 ml	EtOH (96%)
125 µl	Formaldehyd (37%)
95 ml	dH <sub>2</sub> O

#### Waschlösung:

20% (v/v)	EtOH
-----------	------

#### Sensibilisierungslösung:

50 mg	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
250 ml	dH <sub>2</sub> O

#### Färbelösung:

200 mg	AgNO <sub>3</sub>
66 µl	Formaldehyd (37%)
100 ml	dH <sub>2</sub> O
Immer frisch anzusetzen und auf 4°C halten	

#### Entwickler:

15 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
1 mg	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
125 µl	Formaldehyd (37%)
250 ml	dH <sub>2</sub> O

#### Stopplösung:

30 ml	Eisessig
220 ml	dH <sub>2</sub> O

### **3.4. Außenmembranvesikel (OMV)**

#### **3.4.1. Isolierung von Außenmembranvesikeln**

Außenmembranvesikel (OMV) wurden mittels Ultrazentrifugation (Optima L-90K) für die weitere Verwendung im Makrophagenmodell gewonnen. Das autoklavierte Nährmedium wurde für die OMV-Isolierung nochmals steril filtriert (Porengröße: 0,45 µm), um größere Partikel, die eine spätere Quantifizierung der OMVs verfälschen, abzutrennen. Zur Isolierung wurde eine 500 ml Übernachtskultur in filtriertem LB Medium angesetzt und tags darauf pelletiert (Z! 8000rpm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde abermals steril filtriert (0,45 µm Porengröße), um verbliebene Bakterien zu entfernen. Die Proben wurden ab jetzt konsequent

### 3. Methoden

---

gekühlt, um Degradation zu vermeiden. Im Anschluss wurden die OMVs mit Hilfe der Ultrazentrifuge pelletiert (Z! 20.000 rpm, 3 h, 4°C, SW-32 Rotor) und die Pellets der einzelnen Zentrifugen-Röhrchen in insgesamt 400 µl DPBS gesammelt resuspendiert.

Die Konzentrationsbestimmung der OMVs in der wachsenden Kultur erfolgte direkt aus dem Kulturmedium. Dazu wurden 50 ml des steril filtrierten Mediums (0,22 µm Porengröße) mit 1 ml einer OD<sub>600nm</sub> 0,5 Kultur des entsprechenden Bakterienstammes beimpft und kultiviert. Nach jeweils 3 h und 5 h wurden 15 ml der Kultur entnommen und die Bakterien pelletiert (Z! 10.000 rpm, 30 min, 4°C). Anschließend wurden die obersten 1 ml des Überstands abgenommen, mit 3 µl Gentamicin versetzt und mit der im Folgenden beschriebenen Methode quantifiziert.

#### **3.4.2. Quantifizierung der OMV Konzentration**

Die Quantifizierung der OMV-Menge erfolgte automatisiert unter Zuhilfenahme der FACS-Technik (engl.: „*Fluorescence activated cell sorting*“) nach der von Wieser *et al.* (Wieser et al., 2014) beschriebenen Färbemethode. Bei der FACS-Technik werden einzelne Zellen oder Partikel mittels eines Kapillarsystems durch einen Laserstrahl geführt. Mit Detektoren wird das Vorwärtstreulicht, Seitwärtstreulicht und Fluoreszenzlicht eingefangen, das von den durchfließenden Partikeln ausgeht. Die Größe der Partikel kann dabei durch das Vorwärtstreulicht ermittelt werden, während das Seitwärtstreulicht Auskunft über deren Granularität gibt. Durch fluoreszierende Farbstoffe oder antikörpergebundene Fluorochrome können die Partikel gefärbt und anschließend in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Wegen der niedrigen Lichtintensität der gefärbten OMVs war eine Veränderung am Lichtfiltersystem des FACS Canto<sup>TM</sup> II nötig. Deswegen wurde das Filtersystem so angepasst, dass die Lichtausbeute im Rotlichtbereich (610 nm ± 20 nm) im Maximalen liegt.

Die OMVs wurden mit dem Fluoreszenz-Farbstoff FM1-43 (Invitrogen) gefärbt. Dieser lagert sich reversibel in die Membran ein und kann im PerCP-Cy5-Kanal des FACS Canto<sup>TM</sup> II detektiert werden. Der Farbstoff wurde in einer Verdünnung von 1:10.000 den Proben zugesetzt und für 10 min bei RT im Dunklen inkubiert. Da FM1-43 nur in die Membran eingelagert ein ausreichendes Lichtsignal erzeugt, war ein nachgelagerter Waschschriff nicht notwendig. Danach wurden die Proben zügig bei einer mittleren Flussrate für jeweils eine Minute in Triplikaten gemessen. Durch das Setzen von Auswahlbereichen (engl.: „*gates*“) wurden Agglomerate

ausgeschlossen und Partikel erfasst, die ein Signal im PerCP-Cy5 liefern. Die Auswertung der Messungen erfolgte abschließend mit der FlowJo 7.6.1. Software.

## **3.5. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

### **3.5.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**

J774A.1 Makrophagen wurden in RPMI 1640, versetzt mit 10% (v/v) FBS und 1% (v/v) einer Penicillin/Streptomycin (P/S) Lösung, bei einer Temperatur von 37°C in einer feuchten CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5%) kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluität von ca. 80% mit DPBS gewaschen und passagiert. Dabei wurden die adhärennten Makrophagen mechanisch mit einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst.

#### **3.5.1.1. Einfrieren eukaryotischer Zellen**

Für eine Langzeitlagerung wurden J774A.1 Makrophagen bei einer Konfluenz von ca. 80% geerntet, auf eine Zellzahl zwischen  $8 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Dem Aufteilen in vorgekühlte Kryoröhrchen, in Aliquote zu je 1 ml, folgte dann ein dreistufiger Einfrierprozess. Zuerst wurden die Aliquote 2 h bei -20°C und anschließend 24 h bei -80°C gelagert, um final in flüssigem Stickstoff bei -196°C archiviert zu werden.

#### **3.5.1.2. Auftauen eukaryotischer Zellen**

Aufzutauende Zellen wurden schnellstmöglich aus dem flüssigen Stickstoff genommen und im Warmwasserbad (37°C) aufgetaut. Die Zellen wurden direkt nach dem Auftauen in vorgewärmtes Medium überführt und dann unter Standardbedingungen weiter kultiviert.

#### **3.5.2. In vitro Infektionen**

*In vitro* Infektionen der Makrophagen wurden durchgeführt, um die Stärke der Immunantwort auf verschiedene Bakterienstämme und Mutanten anhand der Zytokin-Ausschüttung zu analysieren. Alle *in vitro* Infektionen wurden in Triplikaten und jeder Versuch in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

##### **3.5.2.1. Infektionen mit vitalen Bakterienkulturen**

Am Tag vor der Infektion wurden  $8 \times 10^4$  J774A.1 Makrophagen pro Well einer 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät. Das Kulturmedium der Zellen wurde 2 h vor der Infektion in RPMI 1640 mit 10% (v/v) FBS ohne Antibiotika gewechselt (200 µl pro Well). Die Berechnung der benötigten Bakterienzahl, um die gewünschte Multiplizität der Infektion (MOI) zu erreichen, geschah ausgehend von einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Makrophagen pro Well (nächtliches Wachstum von ca. 20-25% einbezogen). Die verwendeten Bakterienstämme wurden von einer Übernachtskultur 1:50 in frisches Kulturmedium überimpft und danach 1 ml Bakterienkultur bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 geerntet (Z! 6000 rpm, 5min). Anschließend wurden sie in einer der benötigten Konzentration (KBE/ml) entsprechenden Menge in steriles DPBS überführt und in der berechneten Anzahl zu den Makrophagen gegeben. Um die Bakterien auf den Plattenboden abzusenken, wurde ein weiterer Zentrifugationsschritt (200 g, 3 min) durchgeführt. Nach der gewünschten Zeitspanne wurden die Überstände abgenommen und sofort für die weitere Zytokin-Analyse bei -20°C eingefroren (siehe 3.6.).

##### **3.5.2.2. Co-Inkubation mit abgetöteten Bakterien**

Makrophagen wurden nicht nur mit lebenden Bakterien infiziert, sondern auch mit Bakterien, die zuvor entweder durch Hitzedenaturierung oder durch Formalin-Fixierung abgetötet wurden. Die Infektion lief jeweils wie oben beschrieben ab (siehe 3.5.2.1).

Hitzedenaturierung fand für 10 min bei 100°C statt, nachdem die geernteten Bakterien in DPBS aufgenommen wurden.

Für die Abtötung durch Formalin wurden 1,2 ml einer  $OD_{600nm}$  0,5 Bakterienkultur geerntet (Z! 6000 rpm, 5min). Die Kultur wurde im Anschluss mit 3,7% (v/v) Formalin versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Es wurden 20% mehr Bakterienkultur verwendet als rechnerisch nötig,

um den Verlust durch die zwei nachgeschalteten Waschschr tte zu kompensieren. Daher wurde die Berechnung der MOI auf Basis von 1 ml geernteter Kultur durchgeführt. Danach wurde die Suspension zweimal mit sterilem DPBS gewaschen (Z! 6000 rpm, 5 min) und das Pellet in einer, der benötigten Konzentration (KBE/ml) entsprechenden Menge, sterilem DPBS aufgenommen. Die Kontrolle der Abtötung erfolgte durch einen Ausstrich von 50 µl Suspension auf Blutagarplatten.

#### **3.5.2.3. Stimulation der Makrophagen mit LPS**

Für einzelne Versuchsansätze erfolgte eine direkte Stimulation der Makrophagen mit LPS. Auch wurden Prä- und Poststimulationen durchgeführt, bei denen LPS vor bzw. nach der bakteriellen Infektion zu den Makrophagen gegeben wurden. Es wurde entweder hoch reines LPS aus dem Labor von Prof. Dr. Otto Holst (siehe 3.3.1.) oder kommerzielles *E. coli* O26:B6 LPS (Sigma-Aldrich; St. Lois, Missouri, USA) für die Stimulation verwendet. Die Makrophagen wurden jeweils wie oben beschrieben am Vortag ausgesät (siehe: 3.5.2.1.).

Eine LPS Stimulation erfolgte durch die Zugabe von 1 ng LPS bzw. 100 ng LPS pro Well, was einer LPS Konzentration von 5 ng/ml bzw. 500 ng/ml entsprach. Die Überstände wurden nach der gewünschten Zeit abgenommen und umgehend für die nachfolgende Zytokinanalyse bei -20 C eingefroren.

Um Makrophagen vor der bakteriellen Infektion zu stimulieren, wurde 30 min vor der Zugabe der Bakterien 100 ng LPS pro Well (entspricht 500 ng/ml) zugesetzt. Eine Poststimulation erfolgte 30 min nach der ersten Stimulation oder Infektion der Makrophagen. Der weitere Infektionsversuch verlief wie oben beschrieben (siehe: 3.5.2.1.).

#### **3.4.2.4. Stimulation der Makrophagen mit bakteriellem Kulturüberstand**

Durch die Zugabe von steril filtriertem bakteriellem Kulturüberstand wurde die Wirkung von gelösten, bzw. sezernierten Bakterienbestandteilen auf J774A.1 Makrophagen getestet. Die Bakterien wurden ausgehend von einer 1:50 verd nnnten Übernachtkultur bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden sie pelletiert (Z! 8000 rpm, 10 min,) und der Überstand bei einer Porengröße von 0,45 µm steril filtriert. Von jeder Probe wurde eine Charge für 10 min bei 100 C gekocht, um darin enthaltene Proteine zu denaturieren.

### 3. Methoden

---

Pro Vertiefung wurden anschließend 33 µl des filtrierten, entweder unbehandelten oder gekochten, Kulturüberstands zugegeben. Dies entspricht dem Volumen, das bei einer MOI von 50 KBE/ml ohne Aufkonzentration der Bakterienmenge verwendet wird. Die Überstände der Makrophagen wurden abschließend nach der gewünschten Zeit abgenommen und direkt bei -20°C für die weitere Zytokin-Analyse eingefroren.

#### **3.4.2.5. Stimulation der Makrophagen mit Außenmembran-Vesikeln (OMV)**

Die Immunogenität von Außenmembran-Vesikeln (OMVs) der Stämme UTI89 und UTI89 $\Delta galU$  wurde ebenfalls im Makrophagen-Stimulationsmodell betrachtet. Die geernteten OMVs (siehe 3.4.1.) wurden dafür in einer Endkonzentration von 2.500 OMVs/µl zu den Makrophagen gegeben. Das Aussäen der Makrophagen, der Mediumwechsel und das Abnehmen der Überstände wurde auf die zuvor beschriebene Art und Weise praktiziert (siehe 3.5.2.1.).

#### **3.5.3. Ermittlung der Bakterienzahl im Infektionsversuch**

Es erfolgte eine Bestimmung der Bakterienzahl pro Well bei Co-Kultivierung mit J774A.1 Makrophagen. Hierzu wurde der Infektionsansatz im größeren 24-Well Format, zu analogen Bedingungen des 96-Well Formats durchgeführt. Nach verstrichener Inkubationszeit, wurde dem Ansatz 0,1% (v/v) Triton X-100 zugefügt, 10 min später die Vertiefung ausgekratzt und der Inhalt in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Gesamt-KBE pro ml des Infektionsansatzes wurde im Anschluss durch Ausplattieren einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf LB-Platten ermittelt.

#### **3.5.4. Zell-Überlebens-Versuche**

Die Überlebensrate der Makrophagen bei der *in vitro*-Infektion mit diversen Bakterienstämmen wurde durch den „Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay“ bestimmt. Für diesen auf der Aktivität von Luciferase basierenden Versuch wurden am Vortag  $4 \times 10^4$  Makrophagen pro Well in eine lichtundurchlässigen 96-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium in 100 µl RPMI 1640 mit 10% (v/v) FBS ohne Antibiotika pro Well gewechselt. Danach wurden

### 3. Methoden

---

Bakterien analog zur *in vitro*-Infektion geerntet und in der gewünschten MOI zu den Makrophagen gegeben. Im Anschluss an die gewählte Inkubationszeit wurden pro Well 100 µl „Cell Titer-Glo“ Reagenz zugegeben und die Platte für 2 min bei 600 rpm geschüttelt. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit konnte die Lumineszenz in Relativen Lichteinheiten (RLU) im Multiplattenleser (Tristar LB 941) ausgelesen werden.

#### **3.5.5. Gentamicin Protektionsversuche**

Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde durch Gentamicin-Protektionsversuche ermittelt (Mulvey et al., 2001). Gentamicin gehört zur Klasse der Aminoglykosid-Antibiotika und verhindert das Ablesen der mRNA an den Ribosomen, indem es an die 30s-Untereinheit bindet. Es ist ein nicht Membran-gängiges Antibiotikum und tötet somit alle extrazellulär vorkommenden Bakterien ab, während es intrazellulär lebende Bakterien nicht schädigt.

Am Vortag wurden  $5 \times 10^5$  Makrophagen pro Well in eine 24-Well Platte ausgesät. 2 h vor Infektion wurde das Kulturmedium in 1 ml RPMI 1640 mit 10% (v/v) FBS ohne Antibiotika gewechselt und anschließend die Bakterien in einer MOI von 1 und 10 zu den Makrophagen gegeben wie unter Punkt 3.5.2. beschrieben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden sowohl die Gesamtkeimzahl pro Well als auch die Anzahl intrazellulärer KBE bestimmt.

Für die Ermittlung der Gesamtkeimzahl wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zu der Probe gegeben und das Well nach 10-minütiger Inkubationszeit ausgekratzt. Nachfolgend wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe angelegt und die Verdünnungsstufen auf LB-Platten ausplattiert. Nach Auszählung der KBE pro Platte wurde die Zellzahl pro ml berechnet.

Um die Anzahl intrazellulär präsender Bakterien zu berechnen, wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und anschließend in 1 ml einer Gentamicin-Lösung (100 µg/ml) für eine Stunde weiter kultiviert. Im Anschluss an drei weitere Waschschrte mit DPBS wurde eine 0,1% (v/v) Triton X-100-Lösung für 10 min auf die Zellen gegeben und zur Berechnung der Keimlast (KBE/ml) wie oben beschrieben verfahren.

#### **3.6. Zytokin ELISA**

Zur Quantifizierung des von den murinen Makrophagen ausgeschütteten Zytokins TNF- $\alpha$ , wurden ELISA-Analysen durchgeführt. Der Sandwich-ELISA ist ein Antikörper basiertes Nachweisverfahren. Dabei wird die Zielstruktur (hier TNF- $\alpha$ ) mit einem Fängerantikörper (engl.: „*capture antibody*“) beschichteten Multititerplatte gebundenen. Im nächsten Schritt wird ein Detektionsantikörper (engl.: „*detection antibody*“) an die immobilisierte Zielstruktur gebunden. Der Detektionsantikörper wird danach mit einem Reporterenzym gekoppelt. Durch die Stärke der vom Reporterenzym katalysierten Reaktion lässt sich die Menge der gebundenen Ziel-Antigene quantifizieren. Als Reporterenzym diente in diesem Fall Meerrettichperoxidase (HRP), welche durch eine Biotin-Streptavidin-Bindung an den Detektionsantikörper gebunden wurde. Die HRP erzeugt dann durch die Umsetzung des TMB Substrats (Becton Dickinson) eine Blaufärbung der Lösung.

Für die Durchführung der ELISA- Versuche wurde das „Murine TNF- $\alpha$  ELISA Development Kit“ der Firma Peprotech verwendet. Die Versuche wurden nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Der Fängerantikörper wurde hierfür in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , der Detektionsantikörper in einer Konzentration von 0,125  $\mu\text{g/ml}$  und das Streptavidin-HRP Konjugat (BD Pharmingen<sup>TM</sup>) in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Am Ende wurde der entstehende Farbumschlag in fünf minütigen Intervallen für insgesamt 50 min, bei einer Wellenlänge von 405 nm, im Plattenleser (Tristar LB 941) dokumentiert.

#### **3.7. Biolog Analysen**

Mit Hilfe von Biolog<sup>TM</sup>-Analysen (Biolog Inc., Hyward, Kalifornien, USA) wurde der Kohlenstoffmetabolismus von *E. coli*-Stämmen und erstellter *E. coli*-Mutanten charakterisiert. Bei der Biolog<sup>TM</sup>-Technologie handelt es sich um phänotypische Mikroarrays, in denen die bakterielle Stoffwechselaktivität unter definierten Rahmenbedingungen beschrieben wird, wie etwa der Verfügbarkeit einzelner Nährstoffquellen.

Für die Biolog<sup>TM</sup>-Analyse werden spezielle 96-Well Mikrotiterplatten verwendet, die je Well mit unterschiedlichen Substanzen beschichtet sind, wie z.B. verschiedenen Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen. Diese Platten werden dann mit einem Farbstoffmix und dem zu



### 3. Methoden

---

untersuchenden Bakterienstamm befüllt und für 24 h inkubiert. Wenn das in dem jeweiligen Well vorhandene Substrat vom Bakterium verwertet werden kann entsteht ein Farbumschlag, der sich bei einer Absorption von 590 nm quantifizieren lässt. Dadurch kann ermittelt werden, welche Substanzen als Nährstoffquelle dienen, aber auch ob z.B. durch bestimmte Stoffe der Metabolismus gehemmt wird.

In dieser Arbeit wurden die Biolog<sup>TM</sup>-Platten PM1 (Kat. # 12111) und PM2A (Kat. # 12112) zur Charakterisierung der vom Bakterium verwendeten Kohlenstoffquellen benutzt. Die zu analysierenden Stämme wurden über Nacht auf R2A-Agarplatten kultiviert. Zuerst wurde das Inokulationsmedium IF-0a im Verhältnis 5:1 (v/v) mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und darin eine 42%ige Transmissionskultur der Bakterien eingestellt. Weiterhin wurde eine Farbstofflösung des verdünnten IF-0a Mediums (Kat. # 72268) und des Farbstoffmix (engl.: „*dye mix*“; Kat. # 74221) in einer Endkonzentration von 1,2% (v/v) erstellt. Im Anschluss wurde die Farbstofflösung mit der 42%ige Transmissionskultur im Verhältnis von 4:1 (v/v) vermengt und die Biolog<sup>TM</sup>-Platte mit je 100µl pro Well beimpft. Abschließend wurde die mit einer atmungsaktiven Folie verschlossene Biolog<sup>TM</sup> Platte für 24 h bei 37°C bebrütet und im Multiplattenleser (Tristar LB 941) bei einer Wellenlänge von 590nm ausgelesen. Die Versuche wurden pro Platte und Bakterienstamm in dreifacher Wiederholung durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Uropathogene *Escherichia coli*-Stämme modulieren die *in vitro* Immunantwort**

Aus Versuchen unserer Arbeitsgruppe wie auch aus der Literatur ist bekannt, dass uropathogene *Escherichia coli*-Stämme (UPEC) die Immunantwort zu ihren Gunsten beeinflussen können (Cirl et al., 2008; Hunstad et al., 2005). Einige UPEC-Stämme besitzen Pathogenitätsfaktoren, wie zum Beispiel das Protein TcpC, mit dem sie aktiv die Signalkaskade des Toll-like-Rezeptor 4 inhibieren können (Cirl et al., 2008). Allerdings kommt das Protein TcpC nur bei 30% aller Sepsis und 50% aller Pyelonephritis Isolate vor (Schubert et al., 2010) und fehlt bei zahlreichen Isolate, die dennoch eine immunmodulatorische Wirkung analog zum TcpC zeigen (Prof. Sören Schubert – mündliche Mitteilung). Offenbar existieren daher weitere, TcpC-unabhängige Mechanismen der Immunmodulation, die noch völlig unbekannt sind. Auch der für diese Arbeit verwendete Stamm UTI89 besitzt kein TcpC, so dass er sich zur Untersuchung weiterer immunmodulierender Mechanismen in UPEC empfahl.

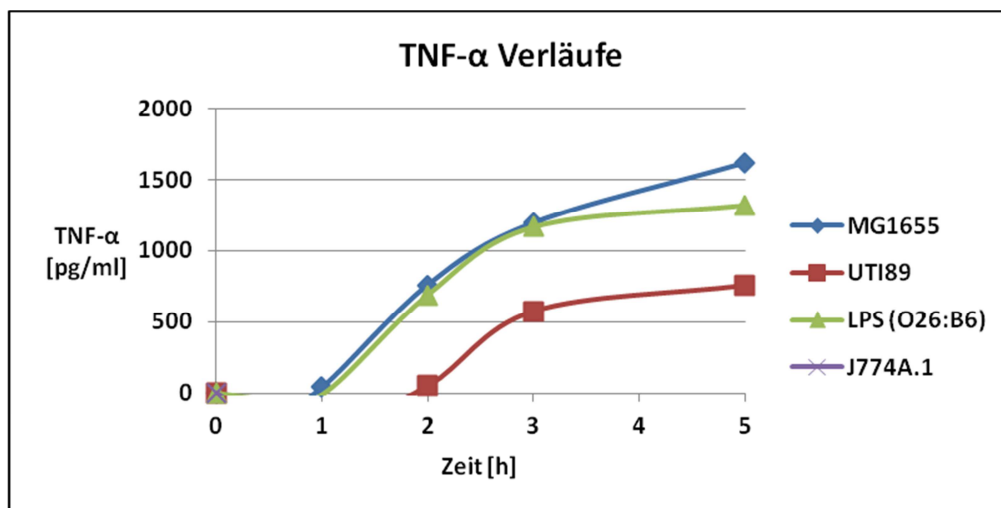
#### **4.1.1. Reduzierte TNF- $\alpha$ -Immunantwort gegenüber Stamm UTI89 im Vergleich zu *E. coli* K12**

Die Stärke der Immunantwort wurde durch die Quantifizierung des im Zellkulturversuch ausgeschütteten proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ermittelt. TNF- $\alpha$  wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und ist ein essentielles Schlüssel-Zytokin für die Regulation der Wirtsantwort. Daher eignet es sich um die Stärke der Immunantwort abzubilden (Hehlhans and Pfeffer, 2005). Es handelt sich auch um ein frühzeitig ausgeschüttetes Zytokin, das für die Rekrutierung von Immunzellen zum Infektionsort verantwortlich ist. Außerdem wurde gezeigt, dass es auch bei HWI eine wichtige Rolle spielt und bereits zu einem frühen Zeitpunkt, durch in der Blase ansässigen Makrophagen oder Dendritischen Zellen, ausgeschüttet wird (Ingersoll et al., 2008).

#### 4. Ergebnisse

Generell wurden die *in vitro* Infektionen in Makrophagen durchgeführt, da bereits einige Daten zur Zytokin-Antwort von Urothelzellen wie z.B. 5637, T24 (Hunstad et al., 2005) und TEU-1 (Billips et al., 2007) vorhanden sind. Makrophagen spielen aber bei entzündlichen Prozessen in der Blase eine ebenso gewichtige Rolle (Bhushan et al., 2011; Engel et al., 2008; Hirose et al., 1992; Ingersoll et al., 2008).

Für die folgenden Infektionsversuche wurden murine J774A.1 Makrophagen verwendet und mit den zu testenden Bakterienstämmen co-inkubiert (Abb. 5). Nach der gewünschten Zeitspanne wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration des Zytokins TNF- $\alpha$  durch ELISA-Analyse ermittelt. Über die Zeit betrachtet nimmt die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung der Makrophagen bei Infektion mit dem *E. coli* K12-Stamm MG1655 (Positivkontrolle) deutlich zu, bis zu ca. 1.600 pg/ml nach 5 h. Im Gegensatz dazu erreicht die TNF- $\alpha$ -Konzentration bei einer Infektion mit dem UPEC-Stamm UTI89 nach 5 h nur ca. 800 pg/ml.



**Abbildung 5: TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen bei Co-Inkubation mit *E. coli* Stämmen**

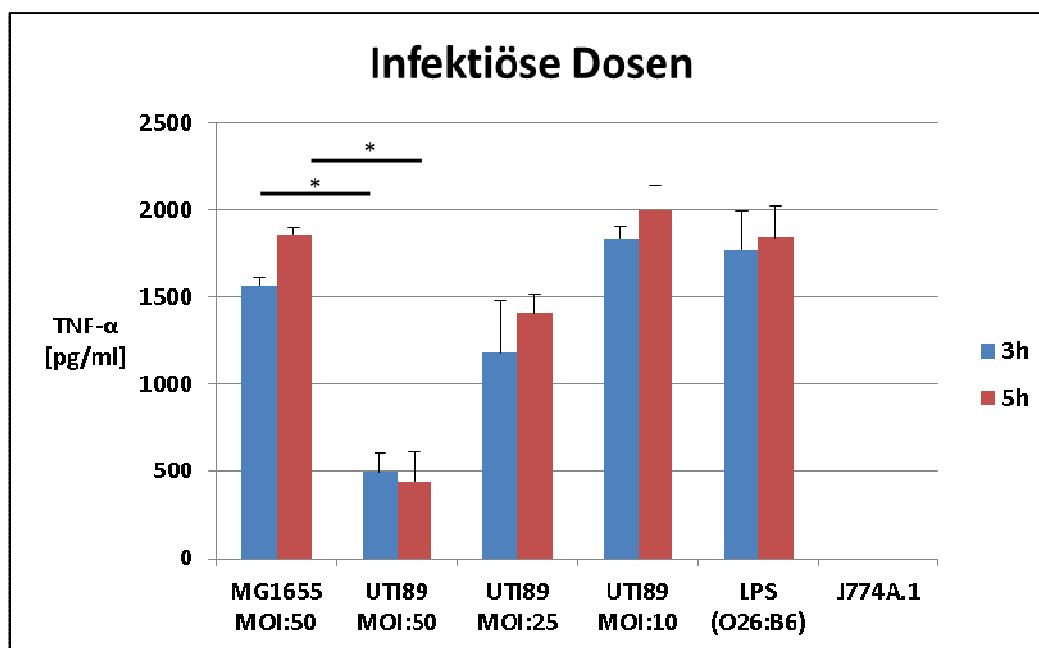
Verläufe der TNF- $\alpha$ -Konzentration [pg/ml] bei der Co-Inkubation von J774A.1 Makrophagen mit dem UPEC-Stamm UTI89 (rot) oder den *E. coli* K12-Stamm MG1655 (blau). Es wurde eine MOI von 50 KBE/Makrophage verwendet. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration der Überstände wurde nach den angezeigten Zeitpunkten durch ELISA-Analysen ermittelt. Als Positivkontrolle dienten mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimulierte (grün) und als Negativkontrolle unbehandelte Makrophagen (lila).

Für die weiteren Experimente ist zu beachten, dass die gezeigten absoluten Zytokin-Konzentrationen eine inter-Test-Variation aufwiesen und zwischen den einzelnen Versuchen abweichen können. Die für biologische Systeme typischen Schwankungen liegen begründet in

der Verwendung von verschiedenen Zellchargen und Passagen der J774A.1 Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten des Projekts. Dennoch spiegeln alle Versuche das gleiche Verhältnis der Zytokin-Antworten gegenüber den einzelnen Teststämmen wieder.

### **4.1.2. Hohe infektiöse Dosis für eine Modulation der Immunantwort nötig**

Anfänglich wurden Bakterien in unterschiedlichen Verhältnissen zu den Makrophagen gegeben (MOI = Multiplizität der Infektion), um zu ermitteln ab welcher infektiösen Dosis ein immunsuppressiver Effekt erkennbar ist. So bedeutet etwa eine MOI von 50, dass 50 koloniebildende Einheiten (KBE) pro Makrophage in den Infektionsansatz gegeben werden. In dem folgenden Versuch wurde eine MOI von 10, 25 und 50 für den UPEC-Stamm UTI89 eingesetzt (Abb. 6). Dabei war bei einer MOI von 50 ein deutlicher Unterschied der Zytokin-Ausschüttung zwischen den Stämmen UTI89 und MG1655 zu erkennen. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration war bei Proben, die mit UTI89 infiziert wurden, bei einer MOI von 50 nach 3 h und 5 h jeweils signifikant geringer als bei MG1655 infizierten Makrophagen oder auch der mit LPS (O26:B6) stimulierten Positivkontrolle ( $P < 0,001$ ). Mit einer abnehmenden MOI verschwand der beobachtete Effekt zusehends, so dass bei einer MOI von 10 die TNF- $\alpha$ -Konzentration der UTI89 infizierten Makrophagen in etwa der Konzentration der Positivkontrolle entsprach (Abb. 6).



**Abbildung 6: TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bei verschiedenen Multiplizitäten der Infektion**

Zytokin-Ausschüttung bei der Infektion von J774A.1 Makrophagen mit verschiedenen infektiösen Dosen. Es wurden der *E. coli* K12-Stamm MG1655 und der UPEC-Stamm UTI89 mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 10, 25 und 50 KBE pro Makrophage verwendet. Die Überstände wurden nach 3 h und 5 h mittels ELISA auf die TNF- $\alpha$ -Konzentration analysiert. TNF- $\alpha$ -Konzentrationen von *E. coli* MG1655 und UTI89 infizierten Makrophagen waren bei einer MOI 50 sowohl nach 3 h als auch 5 h signifikant unterschiedlich ( $P < 0,001$ ), was durch Sterne markiert ist. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Makrophagen und als Positivkontrolle Makrophagen, die mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimuliert wurden.

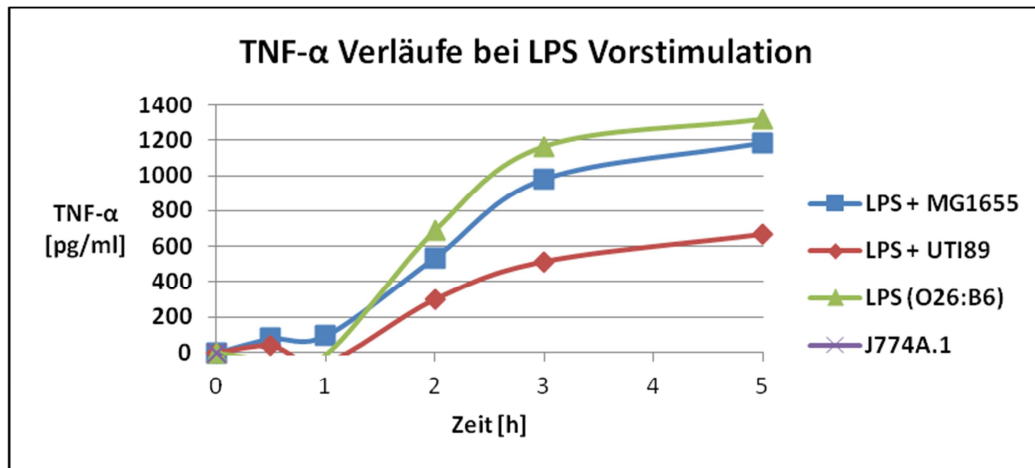
### 4.1.3. Modulation der Immunantwort bei Vorstimulation der Makrophagen mit LPS

Als nächstes gingen wir der Frage nach, ob bei einer Infektion von Makrophagen, die bereits durch einen Stimulus aktiviert sind, immer noch ein Unterschied in der Immunantwort gegenüber *E. coli* K12 bzw. UPEC beobachtet werden kann. Dazu wurden die Makrophagen durch eine Stimulation mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) 30 min vor Zugabe der Bakterien aktiviert. Die aktivierten Makrophagen wurden dann mit einer MOI von 50 KBE pro Makrophage infiziert und die Überstände nach 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 5 h auf die TNF- $\alpha$ -Konzentration untersucht.

Nach einer Stunde begannen die TNF- $\alpha$ -Level der stimulierten und infizierten Proben anzusteigen. Bereits nach 2 h war ein deutlicher Unterschied zwischen den höheren TNF- $\alpha$ -Werten der Co-Inkubation mit MG1655 und den niedrigeren TNF- $\alpha$ -Werten der Co-Inkubation mit UTI89 trotz Vorstimulation zu erkennen (Abb. 7). Nach 3 h ( $P = 0,015$ ) und nach 5 h ( $P =$

#### 4. Ergebnisse

0,04) konnte dann ein signifikanter Unterschied gemessen werden, mit jeweils einer etwa doppelt so hohen Zytokin-Ausschüttung bei Proben des Stamms MG1655 im Vergleich zum Stamm UTI89.



**Abbildung 7: Verlauf der Zytokin-Ausschüttung bei Vorstimulation mit LPS**

Zeitlicher Verlauf der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung [pg/ml] von J774A.1 Makrophagen, die 0,5 h vor Zugabe der Bakterien mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimuliert wurden. Die Makrophagen wurden dann mit dem UPEC-Stamm UTI89 (rot) oder dem *E. coli* K12-Stamm MG1655 (blau) co-inkubiert. Die verwendete MOI war 50 KBE/Makrophage. Die Überstände wurden nach den angezeigten Zeitpunkten abgenommen und die TNF- $\alpha$ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Makrophagen, die mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimuliert wurden, dienten als Positivkontrolle (grün) und unbehandelte Makrophagen als Negativkontrolle (lila).

Zusammenfassend ist auch bei Infektionen bereits aktivierter J774A.1 Makrophagen mit dem UPEC-Stamm UTI89 im Vergleich zum *E. coli* K12-Stamm MG1655 eine signifikant niedrigere Zytokin-Ausschüttung messbar.

#### **4.2. Knockout der Gene *galU* und *purL* im UPEC-Stamm UTI89**

In dieser Arbeit sollten Faktoren, die einen Einfluss auf die für UPEC typische Immunmodulation haben, dargestellt und untersucht werden. Um einen Idee davon zu bekommen, welche Gene und Prozesse dafür wichtig sind, wurde in unserem Labor eine Transposon-Mutagenese im Stamm NU14 durchgeführt. Im Zuge dieser Untersuchung wurden ca. 3000 Transposon-Mutanten auf ein Defizit der Immunmodulation in einem *in vitro* Infektionsmodell geprüft. Dabei konnte bei

Transposon-Insertionen in die Gene *purL* und *galU* eine erhöhte Zytokin-Antwort festgestellt werden. (Christiane Hoffmann - nicht publizierte Daten).

Zur Verifizierung dieser Beobachtungen sollten in einem weiteren UPEC-Stamm diese Gene durch einen gerichteten Knockout (Knockout = vollständiger Funktionsverlust eines Gens) ausgeschaltet werden. Dafür wurde der UPEC-Stamm UTI89 gewählt, da von diesem - im Gegensatz zum Stamm NU14 - bereits eine vollständige Sequenz des Genoms vorliegt (Chen et al., 2006). Neben diesem Vorteil findet der Stamm UTI89 als UPEC Referenzstamm auch in einer Vielzahl von Publikationen Verwendung. Aus diesen Gründen wurde der Stamm UTI89, für die weiteren Analysen dieser Arbeit, dem Stamm NU14 vorgezogen.

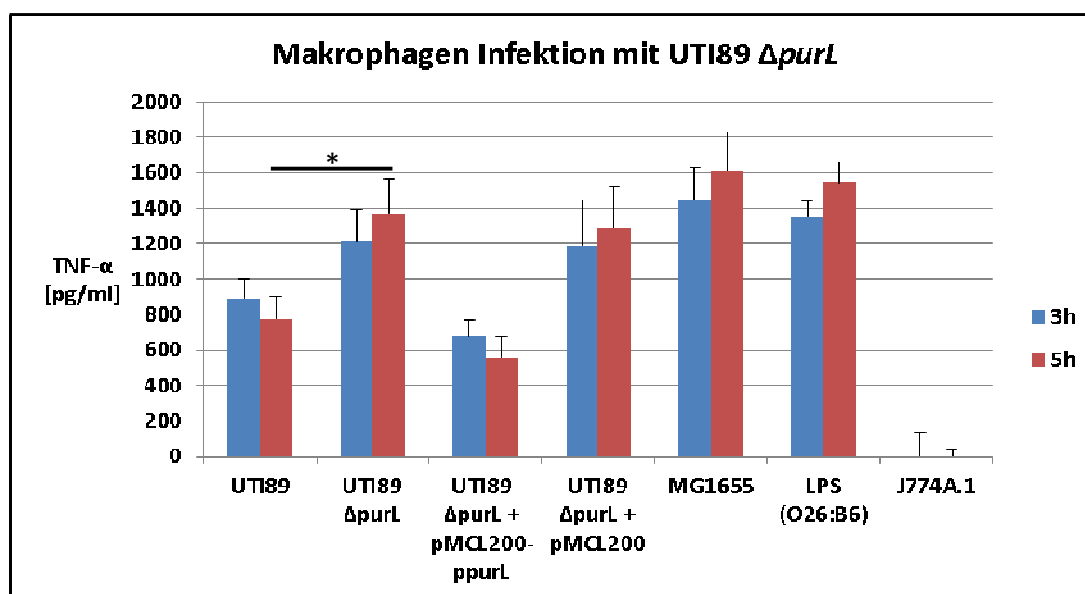
Der genetische Knockout des *purL*- und des *galU*-Gens fand nach der von Datsenko und Wanner beschriebenen Methode statt (Datsenko and Wanner, 2000). Im Zuge dessen konnte durch gezielte Rekombination, unter Zuhilfenahme einer  $\lambda$  Red-Rekombinase, das *galU*-Gen erfolgreich durch eine Kanamycin- und das *purL*-Gen durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette ersetzt werden. Um polare Effekte auszuschließen, wurden die inserierten Resistenzkassetten mit Hilfe einer FLP-Rekombinase wieder aus dem UTI89 Genom entfernt. Sowohl der korrekte Gen-Knockout durch Insertion der Resistenzkassette, als auch deren Deletion wurden durch PCR Analysen kontrolliert. Auf diese Weise konnten die Deletionsmutanten UTI89 $\Delta$ *galU* und UTI89 $\Delta$ *purL* erzeugt werden.

### **4.2.1. Beeinflussung der Zytokin-Ausschüttung durch UTI89 $\Delta$ *purL***

Das Gen *purL* kodiert für die Phosphoribosylformylglycinamid Synthase (FGAMS/PurL). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Amidierung von N-Formylglycinamid-Ribonucleotid (FGAR) zu N-Formylglycinamidin-Ribonucleotid (FGAM) und ist dadurch Teil des *de novo* Purin-Synthese-Prozesses (Zhang et al., 2008).

Bei dem *purL*-Gen ließ eine Transposon-Insertion einen negativen Einfluss auf die Immunmodulation der UPEC vermuten. Zur Verifizierung und weiteren Analyse des Effekts wurde deswegen die UTI89 $\Delta$ *purL* Mutante erschaffen. Diese wurde anschließend mit J774A.1 Makrophagen co-inkubiert und die Zytokin-Antwort nach 3 h und 5 h mit dem Wildtyp UTI89 verglichen (Abb. 8). Um den *purL*-Knockout zu komplementieren wurde das Gen unter Kontrolle des nativen Promotors in das low-copy Plasmid pMCL200 einkloniert. Im Anschluss wurde die

Mutante mit dem hergestellten Komplementations-Plasmid pMCL200-*ppurL* transformiert. Zur Kontrolle des Vektors wurde außerdem UTI89 $\Delta$ *purL* mit dem Vektor pMCL200 transformiert.



**Abbildung 8: Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta$ *purL***

TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von J774A.1 Makrophagen, die mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen für 3 h und 5 h co-inkubiert wurden. Die verwendeten Stämme UTI89, UTI89 $\Delta$ *purL*, UTI89 $\Delta$ *purL* mit dem Komplementations-Plasmid pMCL200-*ppurL*, UTI89 $\Delta$ *purL* mit der Vektorkontrolle pMCL200 und MG1655 wurden in einer Infektionsdosis von 50 KBE pro Makrophage eingesetzt. Mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimulierte Makrophagen wurden als Positivkontrolle und unbehandelte Makrophagen als Negativkontrolle verwendet. Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Der Stern zeigt den signifikanten Unterschied zwischen der Immunantwort gegen UTI89 und UTI89 $\Delta$ *purL* nach 5 h an ( $P = 0,012$ ).

J774A.1 Makrophagen, die mit der UTI89 $\Delta$ *purL* Mutante infiziert wurden, zeigten eine deutlich erhöhte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung gegenüber dem Wildtyp. Der Unterschied der Zytokin-Konzentration war bereits nach 3 h deutlich erkennbar, aber erst nach 5 h signifikant ( $P = 0,012$ ). Weiterhin war die Zytokin-Antwort bei Infektionen mit UTI89 $\Delta$ *purL* etwa 200 pg niedriger als bei Infektionen mit MG1655 oder bei der mit LPS stimulierten Kontrolle. Dieser Unterschied war allerdings gering und nicht signifikant. Die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bei Infektionen mit UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200-*ppurL* war vergleichbar der des Wildtyps UTI89. Somit konnte der Knockout erfolgreich komplementiert werden. Weiterhin entsprach die TNF- $\alpha$ -Konzentration bei Infektionen durch die Vektorkontrolle UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200 denen der Mutante UTI89 $\Delta$ *purL*, was einen Einfluss des Plasmids ausschließt. Zusammenfassend war die Fähigkeit

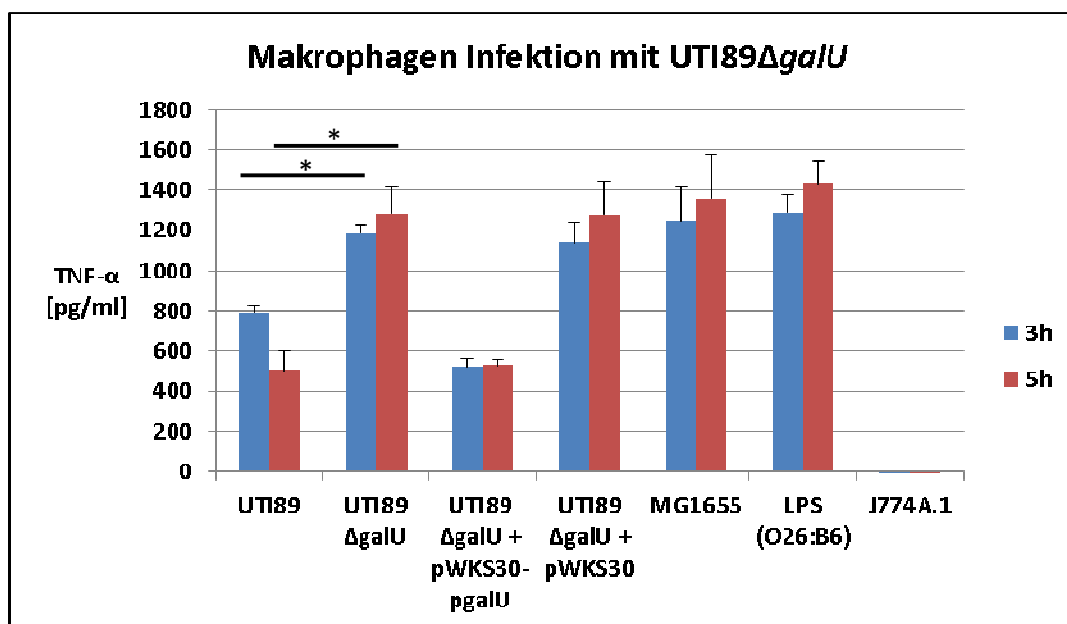


zur Immunmodulation des UPEC-Stammes UTI89 signifikant durch den Knockout des *purL*-Gens beeinträchtigt.

### **4.2.2 Einfluss von UTI89 $\Delta$ galU auf die Zytokin-Antwort im Infektionsmodell**

Das *galU*-Gen spielt eine gewichtige Rolle bei der Synthese von Oligosacchariden in *E. coli* (Schulman and Kennedy, 1977). Es kodiert die UTP-Glucose-1-Phosphat Uridylyltransferase (GalU), welche ein wichtiges Enzym des UDP-Glucosemetabolismus darstellt. Durch das Enzym wird die Reaktion von Glucose-1-Phosphat zu UDP-Glucose unter der Hydrolyse von UTP katalysiert (Weissborn et al., 1994).

Im Folgenden wurde der Einfluss der *galU*-Deletion im Stamm UTI89 auf die Fähigkeit der Immunmodulation im *in vitro* Infektionsmodell getestet. Dazu wurden J774A.1 Makrophagen mit einer MOI von 50 entweder mit dem Stamm UTI89 oder UTI89 $\Delta$ galU infiziert und anschließend das ausgeschüttete TNF- $\alpha$  nach 3 h und nach 5 h quantifiziert (Abb. 9). Weiterhin wurde das *galU*-Gen unter Kontrolle des nativen Promotors in den Vektor pWKS30 einkloniert. Die UTI89 $\Delta$ galU Mutante wurde dann mit dem erstellten Plasmid pWKS30-*pgalU* transformiert, um den genetischen Knockout zu komplementieren. Weiterhin wurde eine Vektorkontrolle erstellt, indem der Stamm UTI89 $\Delta$ galU mit dem Vektor pWKS30 transformiert wurde. Sowohl die Komplementante (UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30-*pgalU*) als auch die Vektorkontrolle (UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30) wurden dann mit einer MOI von 50 in den Infektions-Versuch einbezogen.



**Abbildung 9: Makrophagen Infektion mit UTI89ΔgalU**

*In vitro* Infektionen von J774A.1 Makrophagen mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen und -Mutanten nach 3 h und 5 h. Die Stämme UTI89, UTI89ΔgalU, UTI89ΔgalU mit dem Komplementations-Plasmid pwKS30-pgalU, UTI89ΔgalU mit der Vektorkontrolle pWKS30 und MG1655 wurden in einer MOI von 50 KBE pro Makrophage eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimulierte Makrophagen und als Negativkontrolle unbehandelte Makrophagen. Die TNF-α-Konzentrationen im Überstand wurden mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen der Immunantwort gegen UTI89 und UTI89ΔgalU wurden durch Sterne markiert (3 h:  $P < 0,001$  und 5 h:  $P = 0,002$ ).

Bereits nach 3 h war die TNF-α-Ausschüttung bei Infektionen mit UTI89ΔgalU im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht ( $P < 0,001$ ). Die Zytokin-Werte nach 5 h unterschieden sich noch drastischer voneinander, so dass die TNF-α-Konzentration bei der UTI89ΔgalU-Mutante im Vergleich zum UTI89 Wildtyp ca. 2,5-fach erhöht war ( $P = 0,002$ ). Die Immunantwort auf eine Infektion mit der Mutante war annähernd so stark wie bei Infektionen mit dem *E. coli* K12-Stamm MG1655. Das Defizit der Immunmodulation konnte durch Transformation mit Plasmid pwKS30-pgalU komplementiert werden, so dass die Zytokin-Konzentration der Infektionen wieder annähernd denen des Wildtyps UTI89 entsprach. Infektionen mit der Vektorkontrolle zeigten weiterhin, dass der Vektor pWKS30 keinen Einfluss auf die Komplementation des galU-Knockouts hat. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Deletion des galU-Genes im UPEC-Stamm UTI89 die Fähigkeit zur Immunmodulation signifikant beeinträchtigt.

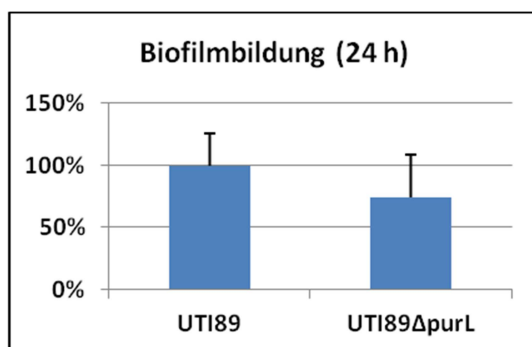
### **4.3. Charakterisierung der UTI89 $\Delta$ *purL* Mutante**

Nachdem ein signifikanter Einfluss der *purL* Deletion auf die Immunmodulation des Stamms UTI89 gezeigt und der Phänotyp des Wildtyps durch Komplementation mit dem Plasmid pMCL200-*ppurL* wieder hergestellt werden konnte (siehe 4.2.1.), wurde die Mutante durch weitere Experimente charakterisiert und analysiert.

Zuerst sollte die Untersuchung der Biofilm und Kapselbildung, sowie der Struktur des LPS Hinweise auf die Gründe für den Verlust der Immunmodulation liefern. Außerdem wurde der Kohlenstoffmetabolismus des Wildtyps UTI89 und der Mutante UTI89 $\Delta$ *purL* durch Biolog<sup>TM</sup>-Analysen betrachtet und durch den Knockout eines weiteren, nachgeschalteten Purinsynthesegens (*purM*) eine Vergleichsmutante erstellt. Zusätzlich wurde die Zytotoxizität der Mutante gegenüber Makrophagen mit einem Luciferase-basierenden Zellüberlebensversuch bestimmt, um einen potentiellen Einfluss auf das *in vitro*-Infektionsmodell zu ermitteln. Weiterhin wurde auch die bakterielle Zellzahl der Mutante im Infektionsmodell quantifiziert. Abschließend wurden Supplementationsversuche mit einem Zwischenprodukt der Purin-Biosynthese aufgrund bestimmter Wachstumsdefizite der UTI89 $\Delta$ *purL*-Mutante durchgeführt.

#### **4.3.1. Quantifizierung der Biofilmbildung**

Von UPEC und auch speziell von Stamm UTI89 ist bekannt, dass diese Bakterien Biofilme bilden können (Wu et al., 2012). Die Bildung von Biofilmen der UTI89 $\Delta$ *purL*-Mutante wurde durch eine Kristallviolett-Färbung untersucht und quantifiziert. Die Ausbildung des Biofilms erfolgte in stehenden Kulturen in speziellen 96-Well Platten über einen Zeitraum von 24 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Biofilme mit Kristallviolett gefärbt und als Maß der Biofilmstärke die Intensität der Färbung bei einer OD 590<sub>nm</sub> ausgelesen. Bei UTI89 $\Delta$ *purL* war bei einer Inkubation in LB Medium eine Reduzierung der Biofilmbildung feststellbar, diese besaß aber keine statistische Signifikanz (Abb. 10). Die Deletion des *purL*-Gens hatte daher einen leicht reduzierenden, aber nicht signifikanten Einfluss auf die Bildung eines Biofilms im Stamm UTI89.

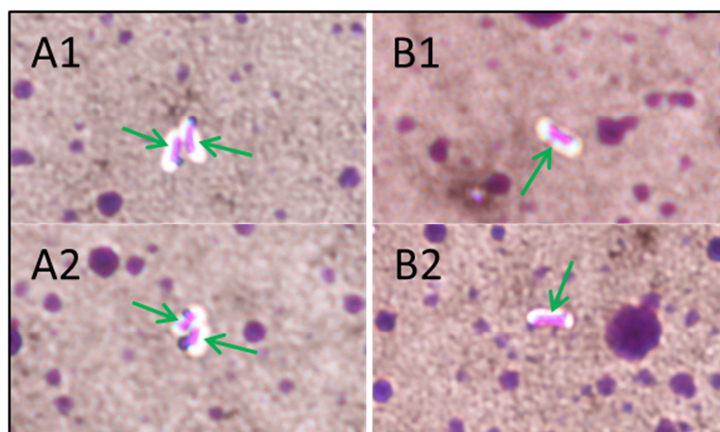


**Abbildung 10: Biofilmbildung von UTI89ΔpurL**

Quantifizierung der Biofilmbildung der Stämme UTI89 und UTI89ΔpurL durch Kristallviolett-Färbung nach 24 h. Die Intensität des Biofilms bei UTI89 wurde auf 100% normiert und die Stärke des Biofilms von UTI89ΔpurL prozentual berechnet.

### 4.3.2. Überprüfung der Kapselbildung

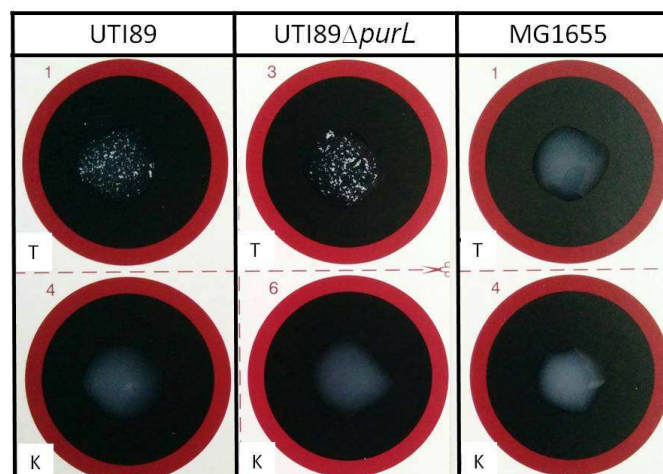
Auch die Ausbildung von Kapseln kann bei *E. coli* beobachtet werden und oft können Kapseln entscheidend zur bakteriellen Pathogenität beitragen (King et al., 2015). Um diesen Aspekt bei der UTI89ΔpurL-Mutante zu analysieren, wurden Tuschepräparate angefertigt und mikroskopisch untersucht. Dabei konnte kein Unterschied in der Kapselbildung zwischen UTI89 und UTI89ΔpurL beobachtet werden. Die Kapsel war bei beiden Stämmen gleichermaßen als heller Hof erkennbar und ähnlich stark ausgeprägt (Abb. 11).



**Abbildung 11: Kapselfärbung von UTI89 $\Delta$ *purL***

Durch ein Tuschepräparat dargestellte Kapseln der *E. coli*-Stämme UTI89 (A1 + A2) und UTI89 $\Delta$ *purL* (B1 + B2) bei 1000 x Vergrößerung. Die Kapsel (grüne Pfeile) ist als ein das Bakterium (pink) umgebender, durchscheinend weißer Hof zu erkennen.

Die Kapsel der UTI89 $\Delta$ *purL*-Mutante wurde zusätzlich mit dem Wellcogen<sup>TM</sup> Latex-Agglutinationstest auf Vorhandensein des K1-Antigen überprüft. Dieser Test führt zu einer Agglutination mit Antikörper-beschichteten Latex-Partikel, die als deutliche Verklumpung sichtbar ist (siehe 3.2.4.). Die Kapsel von UTI89 besitzt das K1-Antigen und sorgt im Gegensatz zum Stamm MG1655, der das K12-Antigen ausprägt, zu einer sichtbaren Verklumpung beim Latex-Agglutinationstest (Abb. 12). Die Untersuchung der Mutante UTI89 $\Delta$ *purL* resultierte auch in einer deutlich sichtbaren Agglutination, was eine korrekte Ausprägung des K1-Polysaccharid-Antigens in der Kapsel zeigt.



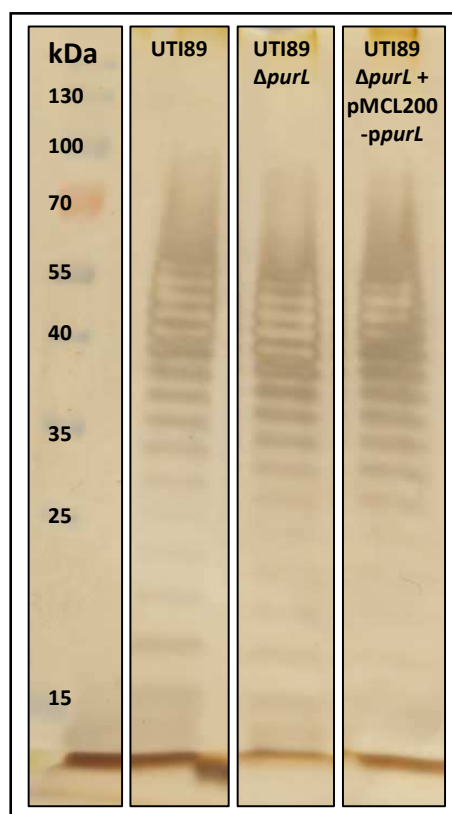
**Abbildung 12: Latex-Agglutinationstest mit UTI89ΔpurL**

Wellcogen™ Latex-Agglutinationstest mit den Stämmen UTI89 (K1), UTI89ΔpurL und MG1655 (K12). Mit „T“ markierte Felder enthalten die Testlösung und mit „K“ markierte Felder eine Kontrolllösung als Negativkontrolle. Stämme, die das K1-Antigen besitzen, zeigen eine deutliche Verklumpung bei Vermengung mit der Testlösung. Bei Stämmen ohne K1-Antigen verbleibt die Testlösung milchig, vergleichbar mit der Kontrolllösung. Beim Stamm UTI89ΔpurL war eine deutliche Verklumpung sichtbar, die eine Ausprägung des K1-Antigens analog zum Wildtyp-Stamm zeigt.

#### 4.3.3. Struktur-Analyse des Lipopolysaccharids

Das Lipopolysaccharid (LPS) gehört bei *E. coli* zu den wichtigsten Strukturen, die in der äußeren Membran zu finden sind. Es ist ein wichtiger Aktivator der Immunantwort, da es z.B. von Makrophagen durch den Toll-like Rezeptor 4 erkannt wird. Durch den daran gekoppelten Signalweg wird unter anderem auch die Ausschüttung von TNF-α reguliert (Raetz and Whitfield, 2002).

Aus diesem Grund untersuchten wir, ob die Struktur des LPS durch die Deletion des *purL*-Gens eine erkennbare Veränderung aufweist. Dazu wurde das LPS des Wildtyps und der Mutante isoliert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und durch eine anschließende Silberfärbung visualisiert (Abb. 13).



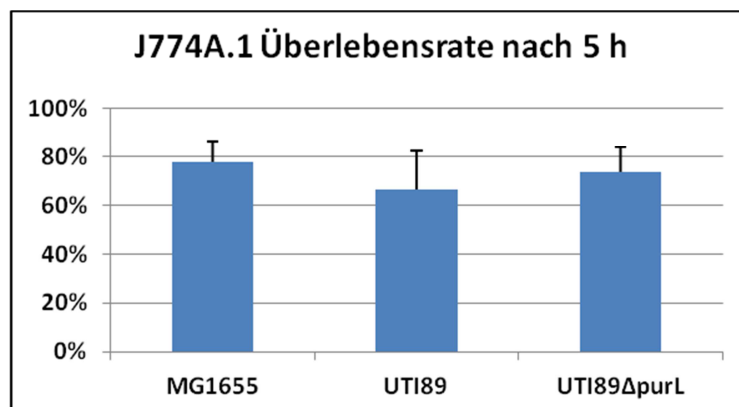
**Abbildung 13: Silberfärbung des UTI89 $\Delta purL$  LPS**

Silberfärbungen des isolierten Lipopolysaccharids der Stämme UTI89 (Spur 2), UTI89 $\Delta purL$  (Spur 3) und UTI89 $\Delta purL$  + pMCL200-*ppurL* (Spur 4). In Spur 1 ist der „Pageruler Protein Ladder“ Größenstandard mit den Größenangaben in kDa aufgetragen.

Auf den silbergefärbten SDS-Gelen war eine charakteristische Leiterstruktur zu erkennen. Diese Leiterstruktur entsprach dem aufgetrennten O-Polysaccharid (O-PS) mit seinen repetitiven Zuckerbausteinen (Zygmunt et al., 2012). Unter der O-PS Leiter waren die Strukturen des aufgetrennten Core-LPS zu sehen. Das isolierte LPS der drei verwendeten Stämme UTI89, UTI89 $\Delta purL$  und UTI89 $\Delta purL$  + pMCL200-*ppurL* besaß bei der Silberfärbung ein nahezu identisches Erscheinungsbild, daher konnte eine größere Veränderung, wie etwa der Verlust des O-PS, bei UTI89 $\Delta purL$  ausgeschlossen werden.

### **4.3.4. Analyse der Zytotoxizität der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante**

Die Zytotoxizität der Bakterien bzw. der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante kann großen Einfluss auf das *in vitro* Makrophagen-Infektionsmodell ausüben. Falls die Zytotoxizität eines Bakterienstammes im Test deutlich stärker als die eines Vergleichsstamms wäre, würde das durch verstärktes und schnelleres Absterben der Makrophagen zur einer deutlichen Beeinflussung der ausgeschütteten Zytokin-Menge führen. Um die Überlebensrate der Makrophagen im Test zu ermitteln, wurde der auf Luciferase-Aktivität basierende „Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability“-Test durchgeführt. Für diesen Versuch wurden J774A.1 Makrophagen unter den für die *in vitro* Infektionen gewählten Bedingungen mit den Teststämmen co-inkubiert. Das Luciferase-Signal unbehandelter Proben wurde als 100% betrachtet und die prozentuale Überlebensrate der mit Teststämmen infizierten Proben darauf zurückgerechnet (Abb. 14).



**Abbildung 14: J774A.1 Überlebensrate bei Co-Inkubation mit UTI89 $\Delta$ purL**

Überlebensraten von J774A.1 Makrophagen, die über einen Zeitraum von 5 h mit dem Stamm MG1655, UTI89 oder UTI89 $\Delta$ purL co-inkubiert wurden. Die Werte sind prozentual bezogen auf nicht behandelte Proben und wurden mit dem „Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability“-Test ermittelt.

Bei Proben, die mit dem *E. coli* K12 MG1655 infiziert wurden, war die Überlebensrate mit ca. 77,6% nach 5 h bei einer MOI von 50 am höchsten. Der UPEC-Stamm UTI89 tötete, mit einer Überlebensrate von ca. 66,4%, die meisten Makrophagen unter gleichen Bedingungen ab. Die Überlebensrate von ca. 73,7% bei den UTI89 $\Delta$ purL infizierten Proben lag zwischen den der beiden anderen Stämmen. Allerdings waren die Unterschiede insgesamt, aber insbesondere zwischen UTI89 und UTI89 $\Delta$ purL, gering und auch nach 4 voneinander unabhängigen



Wiederholungen nicht signifikant. Zusammenfassend lässt sich also in Anbetracht der ähnlichen Überlebensraten der Makrophagen feststellen, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität von Wildtyp und Mutante gibt.

Dieser Rückschluss wurde auch durch das Hämolyse-Verhalten der getesteten Stämme auf Blutagarplatten untermauert. Sowohl UTI89 als auch UTI89 $\Delta$ *purL* zeigten auf den Platten eine vergleichbar starke  $\beta$ -Hämolyse-Zone.

#### **4.3.5. Biolog<sup>TM</sup>-Analysen des Kohlenstoffmetabolismus**

Die Deletion des *purL*-Gens führte zu einer Unterbindung der *de novo* Purinbiosynthese, welche eine wichtige Stoffwechselfunktion des Bakteriums darstellt. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob diese Deletion auch den weiteren Stoffwechsel des Bakteriums, wie etwa den Kohlenstoffmetabolismus, beeinträchtigt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Biolog<sup>TM</sup>-Platten eingesetzt. Diese phänotypischen Microarrays erlauben eine funktionelle Charakterisierung des bakteriellen Metabolismus, indem jede Vertiefung dieser speziellen 96-Well Mikrotiterplatten dem Bakterium eine definierte Nährstoffquelle zur Verfügung stellt. Wenn das jeweilige Substrat dem bakteriellen Stoffwechsel zugeführt werden kann, bildet sich während der 24 stündigen Inkubationszeit ein blauer Farbumschlag, der im Multiplattenleser quantifiziert werden kann. In dieser Arbeit wurden die Biolog<sup>TM</sup>-Platten „PM1“ und „PM2A“ verwendet, um die Stämme UTI89, UTI89 $\Delta$ *purL*, UTI89 $\Delta$ *purL*+pMCL200-*ppurL* und UTI89 $\Delta$ *purL*+pMCL200 in jeweils Triplikat-Untersuchungen auf ihre Stoffwechselaktivität hin zu vergleichen.

Analysen mit der PM1-Platte ergaben bei der Mutante UTI89 $\Delta$ *purL* bei 17 der 95 angebotenen Nährstoffquellen ein Stoffwechseldefizit von mindestens 50% (Tab. 6). Bei diesen 17 Substraten konnte bei sieben sogar nur noch weniger als 30% der ursprünglichen Stoffwechselaktivität durch die Mutante nachgewiesen werden. Auf der PM2A Platte konnten sechs Nährstoffquellen ermittelt werden, bei denen die Stoffwechselaktivität bei maximal 50% lag. Allerdings lag bei keiner dieser Nährstoffquellen die Aktivität unter 30%. Durch Komplementation mit dem Plasmid pMCL200-*ppurL* konnte bei 22 der insgesamt 23 defizitär verwerteten Substrate eine Stoffwechselaktivität von über 50% wiederhergestellt werden. Lediglich bei 3-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl-D-Arabinose lag die metabolische Aktivität mit 49% weiterhin knapp unter der Hälfte der Aktivität des Wildtyps.

Eine Kontrolle des Vektors pMCL200 mithilfe des Stamms UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200 zeigte auf beiden Plattentypen eine sehr niedrige metabolische Aktivität bei vielen Substraten. Diese Aktivität lag oftmals unter der der UTI89 $\Delta$ *purL*-Mutante. Das demonstrierte weiterhin, dass die beobachtete Komplementation bei UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200-*ppurL* auf dem eingebrachten *purL*-Gen und nicht auf dem Vektor pMCL200 beruht. Zudem war sowohl bei der Komplementante als auch der Vektor-Kontrolle ein Stoffwechseldefizit der Substrate Monomethylsuccinat und L-Threonin messbar. Ebenso war eine leichte Verwertung der Substrate D-Raffinose, Melibionsäure und L-Alaninamid bei der Komplementante und der Vektor-Kontrolle zu beobachten. Diese funktionellen Defizite und Zugewinne waren dadurch eindeutig mit dem Einbringen des Plasmids assoziiert.

Schließlich war beim komplementierten Stamm UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200-*ppurL* auffällig, dass das Substrat L-Galactonsäure- $\gamma$ -Lacton, im Gegensatz zu den Stämmen UTI89 oder UTI89 $\Delta$ *purL*, stark metabolisiert wurde. Aufgrund der generell niedrigen Metabolismusrate von UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200 konnte aber keine auffällige Verwertung des Substrats L-Galactonsäure- $\gamma$ -Lacton beobachtet werden.

## 4. Ergebnisse

**Tabelle 6: Biolog<sup>TM</sup> Analysen von UTI89 $\Delta$ purL**

Analysen des Kohlenstoffwechsels der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante im Vergleich zum Wildtyp mittels Biolog<sup>TM</sup>-Platten. Im Folgenden sind alle Substrate aufgeführt, bei denen die Stoffwechselaktivität maximal 50% betrug. Aktivitäten unter 30% sind orange hervorgehoben und ein Totalverlust (0%) in rot. Substrate die durch UTI89 $\Delta$ purL mit dem Komplementationsplasmid pMCL200-ppurL mit weniger als 50% metabolisiert wurden, sind gelb markiert.

Substrat	UTI89 $\Delta$ purL	UTI89 $\Delta$ purL + pMCL200- ppurL	UTI89 $\Delta$ purL + pMCL200	Platte
L-Arabinose	42%	76%	16%	PM1
N-Acetyl-D-Glucosamin	10%	75%	3%	PM1
D-Galactose	44%	85%	10%	PM1
D-Alanin	48%	73%	23%	PM1
D-Trehalose	23%	76%	4%	PM1
D-Mannose	26%	79%	6%	PM1
D-Mannitol	9%	69%	4%	PM1
D-Galactonsäure- $\gamma$ -Lacton	38%	70%	10%	PM1
L-Rhamnose	50%	66%	0%	PM1
D-Fructose	26%	72%	0%	PM1
$\alpha$ -D-Glucose	29%	62%	0%	PM1
Maltose	42%	67%	2%	PM1
D-Melibiose	45%	71%	0%	PM1
$\alpha$ -D-Lactose	28%	76%	0%	PM1
Lactulose	47%	88%	4%	PM1
Uridin	43%	80%	4%	PM1
Methylpyruvat	44%	88%	4%	PM1
N-Acetyl-D-Galactosamin	42%	86%	23%	PM2A
N-Acetyl-Neuraminsäure	43%	90%	24%	PM2A
3-O- $\beta$ -D-Galacto-pyranosyl-D-Arabinose	35%	49%	23%	PM2A
$\beta$ -Methyl-D-Galactosid	35%	69%	21%	PM2A
$\beta$ -Methyl-D-Glucuronsäure	42%	70%	31%	PM2A
Dihydroxyfumarsäure	37%	92%	27%	PM2A

### 4.3.6. Erstellung einer weiteren Purinstoffwechselmutante

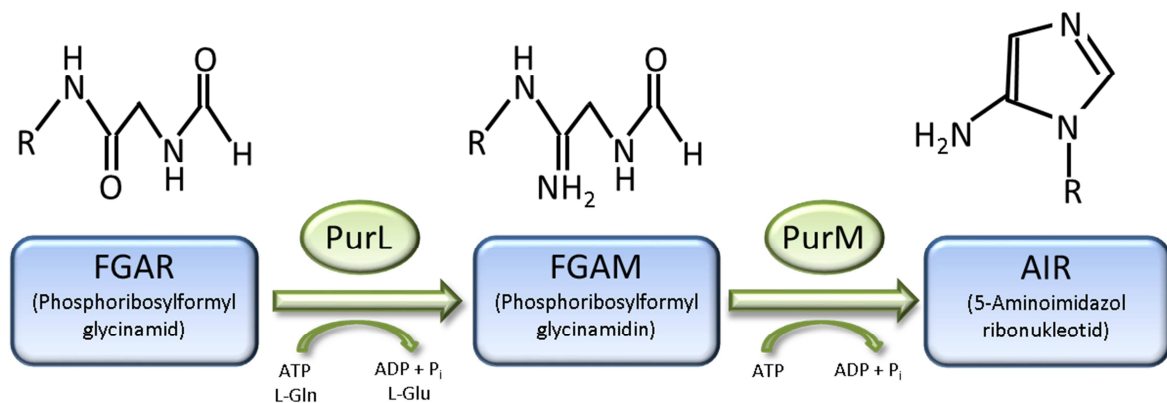
Bei *E. coli* sind die Gene der Purinbiosynthese, anders als zum Beispiel bei *B. subtilis*, nicht in einem einzigen Operon angeordnet, sondern über das ganze Genom verteilt (He et al., 1990). Das purL-Gen liegt auf dem Negativstrang des UTI89 Genoms zwischen 2,8334 Mbp und 2,8374 Mbp. Das Gen wird dabei von den Genen yfhK und yfhD flankiert. Das Gen yfhK kodiert für eine putative sensorähnliche Histidin-Kinase und yfhD für ein mutmaßliches periplasmatisches

## 4. Ergebnisse

Transporterprotein. Um potentielle polare Effekte der *purL* Deletion auf umliegende Gene auszuschließen, wurde eine Deletion in einem weiteren Gen, der Purinsynthesekaskade, eingeführt. Zudem sollte diese zusätzliche Mutante den Verlust der Fähigkeit zur *de novo* Purinbiosynthese als Ursache des beobachteten Phänotyp verifizieren.

### 4.3.6.1. Knockout des *purM*-Gens in UTI89

Die Phosphoribosylaminoimidazole Synthetase (PurM) ist für den PurL nachgeschalteten Schritt der Purinbiosynthese verantwortlich. PurM eignet sich daher gut zur Erzeugung einer zweiten, zur *de novo* Purinbiosynthese unfähigen Mutante, durch Deletion des kodierenden Gens *purM*. Das Enzym PurM katalysiert die ATP-abhängige Umsetzung von Phosphoribosylformylglycinamidin (FGAM) zu 5-Aminoimidazolribonukleotid (AIR) (Abb. 15).



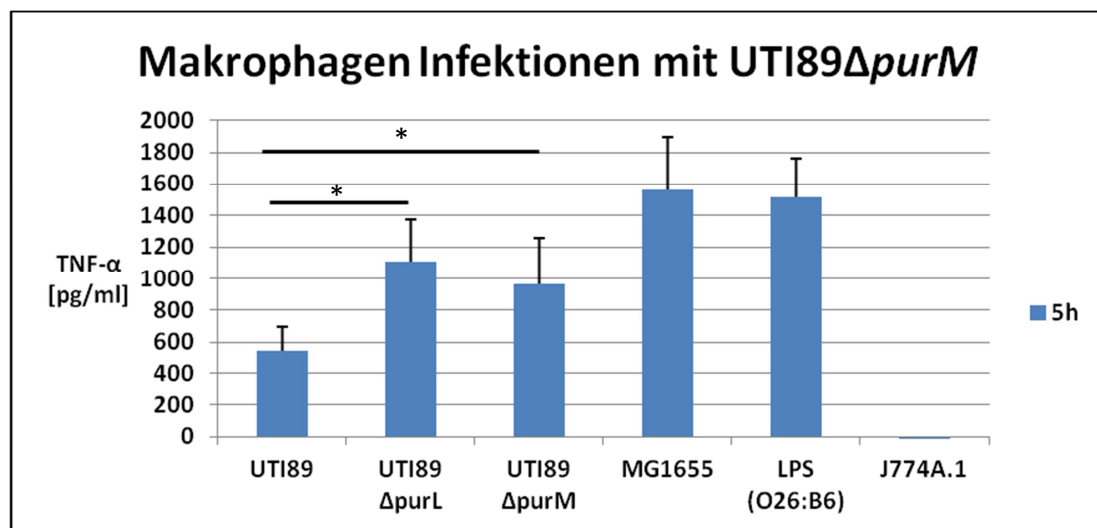
**Abbildung 15: Durch PurL und PurM katalysierte Purinbiosyntheseschritte**

Schema der durch PurL und PurM katalysierten Schritte der Purinbiosynthese. Phosphoribosylformylglycinamid (FGAR) wird durch PurL zu Phosphoribosylformylglycinamidin (FGAM) ATP-abhängig amidiert und anschließend unter Hydrolyse von ATP durch PurM zu 5-Aminoimidazolribonukleotid umgesetzt (Zhang et al., 2008).

Unter Zuhilfenahme der  $\lambda$ -Red Rekombinase-Technik konnte auch das *purM*-Gen, durch Einbringen einer Chloramphenicol-Resistenzkassette in das UTI89 Genom, erfolgreich deletiert werden. Zur Vermeidung polarer Effekte wurde die Resistenzkassette im Anschluss mit Hilfe des Plasmids pCP20 wieder aus dem Genom entfernt und die erfolgreiche Deletion des *purM*-Gens durch PCR-Analysen überprüft. Der entstandene Stamm UTI89 $\Delta$ *purM* wurde im Folgenden im *in vitro* Infektionsmodell mit dem Stamm UTI89 $\Delta$ *purL* verglichen.

#### 4.3.6.2. Erhöhung der Zytokin-Antwort im Infektionsmodell durch UTI89 $\Delta$ purM

Die Frage, ob die Deletion des *purM*-Gens in UTI89 auch einen Einfluss auf die Immunmodulation des Stammes hat, wurde analog zur UTI89 $\Delta$ purL-Mutante durch die Infektion von J774A.1 Makrophagen geklärt. Dazu wurde die Zytokin-Antwort gegenüber beiden Mutanten UTI89 $\Delta$ purL und UTI89 $\Delta$ purM mit der Antwort gegenüber dem Wildtyp-Stamm UTI89 bei einer MOI von 50 nach 5 h Infektionsdauer verglichen. Zur Kontrolle wurden die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bei Infektion mit MG1655, bei einer Stimulation mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) und bei unbehandelten Makrophagen betrachtet (Abb. 16).



**Abbildung 16: Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta$ purM**

TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von J774A.1 Makrophagen, die für die Dauer von 5 h mit verschiedenen *E. coli*-Stämmen infiziert wurden. Es wurden die Stämme UTI89, UTI89 $\Delta$ purL, UTI89 $\Delta$ purM und MG1655 verwendet. Als Kontrolle diente eine Stimulation mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) sowie der Überstand unbehandelter Makrophagen. Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bei Infektionen mit UTI89 waren signifikant niedriger als bei Infektionen mit UTI89 $\Delta$ purL ( $P = 0,012$ ) oder mit UTI89 $\Delta$ purM ( $P = 0,044$ ) (durch Sterne markiert).

Die Zytokin-Antwort gegenüber UTI89 $\Delta$ purM war vergleichbar mit der gegenüber der zweiten, Purinbiosynthese-defizienten Mutante UTI89 $\Delta$ purL. Beide Mutanten verursachten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm UTI89 eine signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Ausschüttung der Makrophagen (UTI89 $\Delta$ purL:  $P = 0,012$ ; UTI89 $\Delta$ purM:  $P = 0,044$ ). Die Zytokin-Antwort gegenüber den beiden Mutanten fiel allerdings nicht so stark aus, wie gegenüber dem *E. coli* K12-Stamm MG1655 oder der mit LPS stimulierten Kontrolle. Dieses Ergebnis zeigte, dass auch eine Unterbrechung der *de*

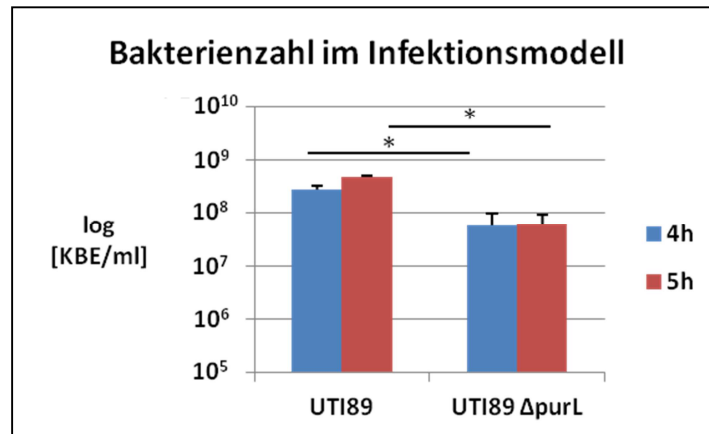
*novo* Purinsynthese durch den Knockout eines anderen Purinbiosynthesegens, wie etwa *purM*, zu einer starken Einschränkung der Immunmodulation im Makrophagen-Infektionsmodell führt.

### **4.3.7. Bestimmung der Zellzahlen von UTI89 $\Delta$ *purL* im Infektionsmodell**

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Zytokin-Ausschüttung im Infektionsmodell kann eine unterschiedliche Wachstumsrate der einzelnen Bakterienstämme im Testsystem sein. Der Wildtyp-Stamm UTI89 und die Mutante UTI89 $\Delta$ *purL*, die sich in ihrem Wachstumsverhalten in dem LB Vollmedium nicht unterscheiden, wurden daher bei einer MOI von 50 mit den Makrophagen (Medium: RPMI 1640 + 10% FBS + 5% P/S) co-inkubiert. Nach 4 h und 5 h wurden dann die jeweiligen Bakterienzahlen (KBE/ml) im Infektionsansatz durch Ausplattieren von logarithmischen Verdünnungsreihen bestimmt.

Sowohl nach 4 h ( $P = 0,006$ ) als auch nach 5 h ( $P < 0,001$ ) ließ sich ein signifikanter Unterschied in den Bakterienzahlen feststellen (Abb. 17). Beim Wildtyp wurde nach 5 h mit  $4,7 \times 10^8$  KBE/ml, im Vergleich zu  $6,0 \times 10^7$  KBE/ml bei der Mutante, eine um fast eine Log-Stufe höhere Bakterienzahl bestimmt. Ausgehend von einer Infektionsdosis von ca.  $2,9 \times 10^7$  KBE/ml hatte sich somit die Bakterienzahl von UTI89 nach 5 h über 15-fach erhöht. Bei der UTI89 $\Delta$ *purL* Mutante stieg sie über 5 h allerdings nur leicht auf etwa das Doppelte der initialen Bakterienzahl an.

Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass das Wachstum oder Überleben der Bakterien im Makrophagen-Infektionsmodell (mit RPMI 1640 Medium + 10% FBS + 5% P/S) durch den Knockout des *purL*-Gens stark beeinträchtigt war.



**Abbildung 17: Bestimmung der Bakterienzahl von UTI89 $\Delta$ purL im Infektionsmodell**

Zellzahlen (KBE/ml) der Stämme UTI89 und UTI89 $\Delta$ purL nach 4 h oder 5 h Co-Inkubation mit J774A.1 Makrophagen, ausgehend von einer MOI von 50 KBE pro Makrophagen. Signifikante Unterschiede der Zellzahlen nach 4 h ( $P = 0,006$ ) und 5 h ( $P < 0,001$ ) wurden mit Sternen gekennzeichnet.

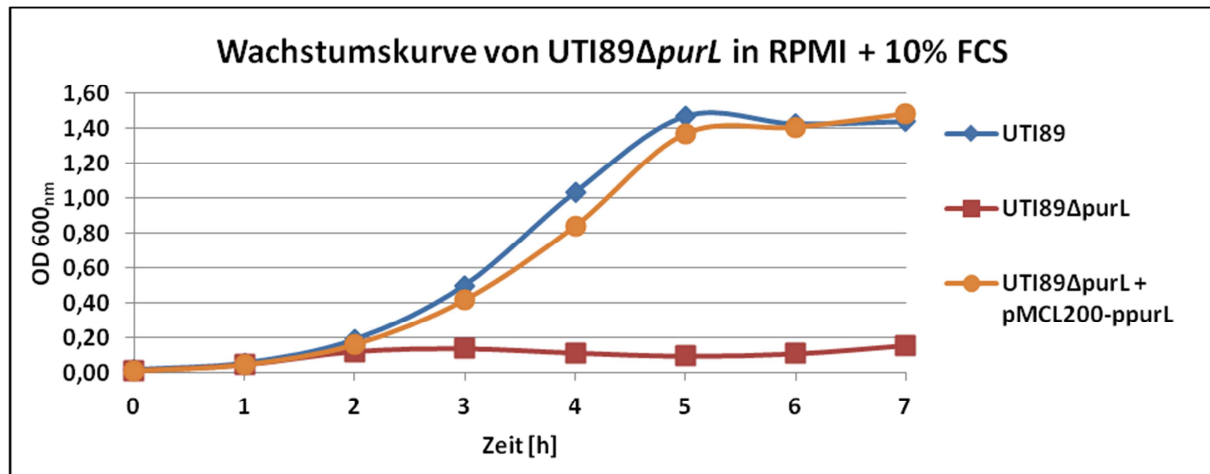
### 4.3.8. Vermindertes Wachstum der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante

Da die Analyse der bakteriellen Zellzahlen im Makrophagen-Infektionsmodell eine signifikant niedrigere Konzentration bei der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante zeigte, wurde das Wachstumsverhalten dieses Stammes genauer betrachtet.

#### **4.3.8.1. Wachstumsdefizite in Zellkulturmedien**

Bereits bei der Herstellung der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante wurde eine Wachstumskurve in LB Medium erstellt, bei der kein Unterschied zum Wildtyp-Stamm, in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit und Zellzahl, festzustellen war (Daten nicht gezeigt). Der Wildtyp-Stamm wies demnach eine Zellzahl von ca.  $1,6 \times 10^8$  KBE/ml und die Mutante eine vergleichbare Zahl von ca.  $1,4 \times 10^8$  KBE/ml bei einer  $OD_{600nm}$  von 0,5 auf.

Aufgrund des oben beschriebenen Ergebnis wurde eine weitere Wachstumskurve in dem zur Kultivierung von Makrophagen benötigten Medium (RPMI 1640 + 10% FBS) erstellt. Dazu wurden die Stämme UTI89, UTI89 $\Delta$ purL und UTI89 $\Delta$ purL + pMCL200-ppurL von einer Übernachtskultur, nach einmaligem Waschen in PBS, zu gleichen Verhältnissen jeweils in RPMI + 10% FBS überimpft und im stündlichen Turnus die  $OD_{600nm}$  bestimmt (Abb. 18).



**Abbildung 18: Wachstumskurven in RPMI 1640 + 10% FBS**

Wachstumskurve von UTI89, UTI89Δ*purL* und UTI89Δ*purL* + pMCL200-*ppurL* in RPMI 1640 + 10% FBS. Als Indikator des Wachstums wurde die OD 600<sub>nm</sub> von allen Stämmen stündlich bestimmt.

Das Ergebnis der Wachstumsversuche in RPMI 1640 + 10% FBS zeigte deutlich, dass bei der UTI89Δ*purL*-Mutante zuerst noch geringfügiges, aber nach ca. 2 h kein Wachstum mehr zu beobachten war. Im Gegensatz dazu besaßen sowohl UTI89, als auch die Mutante UTI89Δ*purL* mit dem Komplementations-Plasmid pMCL200-*ppurL*, eine sigmoidale Wachstumskurve, in der sie etwa zwischen 2 h und 5 h exponentielles Wachstum zeigten und anschließend in eine Plateauphase eintraten. In einem weiteren Kulturmedium (DMEM + 10% FBS) war das Wachstumsverhalten des Wildtyps und der *purL*-Mutante in Vorversuchen identisch zum Ergebnis in RPMI1640 + 10% FBS. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Deletion des *purL*-Gens ein Wachstum in dem Medium stark beeinträchtigte, das für die Kultivierung der J774A.1 Makrophagen benötigt wird.

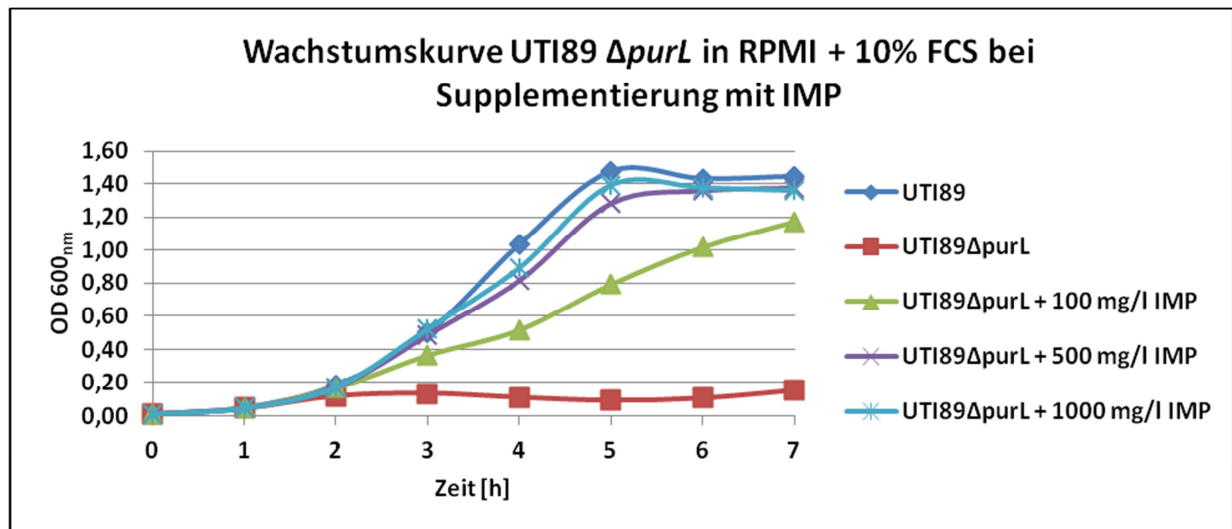
### 4.3.8.2. Supplementierung des Zellkulturmediums mit Inosine-5'-monophosphat

Als nächster Schritt sollte das Wachstum von UTI89Δ*purL* im Makrophagen-Kulturmedium durch Supplementierung mit einem Metabolit der Purinbiosynthese wiederhergestellt und anschließend die Auswirkung auf die Immunmodulationsfähigkeit der Mutante im Infektionsmodell analysiert werden.



#### 4. Ergebnisse

Inosine-5'-monophosphat (IMP) ist ein später Metabolit der Purinbiosynthese, der erst nach den von PurL und PurM katalysierten Syntheseschritten entsteht. IMP eignet sich daher für eine Supplementierung des Kulturmediums. Um eine IMP-Konzentration zur ausreichenden Supplementation zu ermitteln, wurden siebenstündige Wachstumskurven von UTI89 $\Delta$ purL bei Zugabe von verschiedenen Mengen IMP erstellt (Abb. 19).



**Abbildung 19: Wachstumskurve von UTI89 $\Delta$ purL bei IMP-Supplementierung**

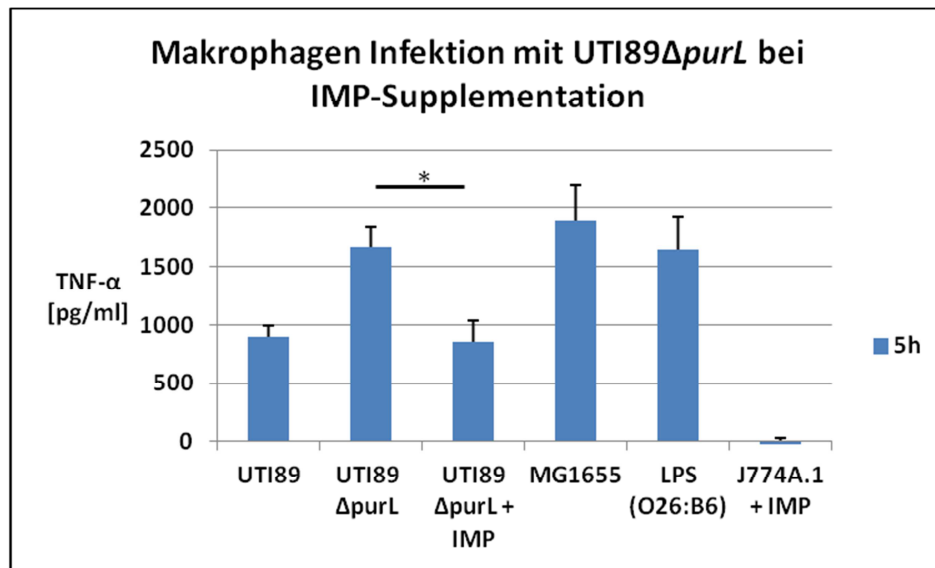
Wachstumskurven der Stämme UTI89 und UTI89 $\Delta$ purL in RPMI 1640 + 10% FCS bei Supplementierung des Mediums durch Inosine-5'-monophosphat (IMP). IMP wurde in den Konzentrationen von 100 mg/l, 500 mg/l und 1000 mg/l dem Medium zugesetzt. Die Bestimmung der OD 600<sub>nm</sub> Werte der Stämme erfolgte stündlich.

Bereits bei einer Zugabe von IMP in einer Konzentration von 100 mg/l konnte das Wachstum der Mutante partiell wiederhergestellt werden. Die Wachstumskurve hatte bereits eine sigmoidale Form, war aber im Vergleich zum Wildtyp immer noch deutlich abgeflacht. Bei einer Zugabe von 500 mg/l IMP war die Wachstumskurve wieder vollständig sigmoidal und zeigte, wie beim Stamm UTI89, exponentielles Wachstums zwischen 2 h und 5 h, allerdings waren noch geringfügige Wachstumsverzögerungen zu beobachten. Eine Supplementation mit 1.000 mg/l IMP war allerdings ausreichend, um ein Wachstumsverhalten von UTI89 $\Delta$ purL zu erreichen, das dem Wachstum des Wildtyp-Stamms UTI89 entsprach.

Im Anschluss wurde die Immunmodulationsfähigkeit der UTI89 $\Delta$ purL-Mutante in IMP-supplementiertem Medium (1.000 mg/l) im Makrophagen-Infektionsversuch getestet (Abb. 20). Die Infektion erfolgte unter Verwendung der üblichen Kontrollen (siehe 4.2.1.). Die TNF- $\alpha$ -Konzentration von Proben mit dem Stamm UTI89 $\Delta$ purL war bei Supplementation mit IMP

#### 4. Ergebnisse

signifikant ( $P < 0,011$ ) niedriger als ohne Supplementation. Während die Zytokin-Antwort gegen die Mutante, ohne Zugabe von IMP, ähnlich stark wie gegen MG1655 war, war sie bei IMP-Supplementation ähnlich niedrig wie bei Infektionen mit dem Wildtyp-Stamm UTI89. Auch die Bakterienkonzentration war, bedingt durch die Supplementation, nach 5 h Co-Inkubation bei UTI89 $\Delta purL$  ähnlich hoch wie beim Wildtyp-Stamm.



**Abbildung 20: Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta purL$  bei IMP-Supplementation**

TNF- $\alpha$ -Konzentration bei Infektionen von J774A.1 Makrophagen mit den Stämmen UTI89 und UTI89 $\Delta purL$ , mit und ohne Supplementation des Mediums durch 1.000 mg/l IMP. Die Bakterien wurden in einer MOI von 50 für 5 h mit den Makrophagen co-inkubiert. Die Zytokin-Antwort gegenüber UTI89 $\Delta purL$  war mit IMP-Supplementation signifikant ( $P < 0,001$ ) niedriger, was durch einen Stern markiert wurde.

Dieses Ergebnis zeigte, dass durch die Zugabe des Purinmetaboliten IMP die Fähigkeit des Wachstums im Makrophagen-Kulturmedium der Purinbiosynthese-Mutante UTI89 $\Delta purL$  wieder hergestellt werden konnte. Neben dem normalen Wachstum bei IMP-Supplementation wurde auch die Fähigkeit zur Immunmodulation im Makrophagen-Infektionsmodell bei UTI89 $\Delta purL$  vollständig wiedererlangt.

### **4.4. Analyse der UTI89 $\Delta$ galU-Mutante**

Im Zuge dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass eine Deletion des Gens *galU* dem UPEC-Stamm UTI89 die Fähigkeit entzieht, die Immunantwort von J774A.1 Makrophagen *in vitro* zu dämpfen. Makrophagen, die mit der Mutante UTI89 $\Delta$ galU für 3 h bzw. 5 h co-inkubiert wurden, schütteten signifikant mehr TNF- $\alpha$  aus als das Wildtyp-Bakterium UTI89. Dieser Effekt konnte außerdem durch extrachromosomale Integration des *galU*-Gens in die Mutante mittels des Plasmids pWKS30-p*galU* komplementiert werden (siehe 4.2.2.).

Im Folgenden sind alle Versuche beschrieben, die zur weiteren Analyse und Charakterisierung der UTI89 $\Delta$ galU-Mutante durchgeführt wurden. Zuerst wurden die Zytotoxizität und die bakterielle Überlebensrate im Makrophagen-Infektionsmodell bestimmt. Weiterhin folgten eine Untersuchung der Biofilmbildung und des intrazellulären Vorkommens, sowie eine Färbung der bakteriellen Kapsel. Auch bei dieser Mutante wurden der Kohlenstoffmetabolismus mittels Biolog<sup>TM</sup>-Analyse und die Struktur des Lipopolysaccharids (LPS) betrachtet. Aufgrund der Ergebnisse der LPS-Färbung wurde eine LPS-Mutante mit einer defizitären O-Seitenkette zum Vergleich mit UTI89 $\Delta$ galU erstellt und damit zusätzliche Zellkulturversuche durchgeführt. Zur weiteren Klärung des beobachteten Phänotyps wurden außerdem *in vitro* Makrophagen-Stimulationsversuche mit aufgereinigtem LPS, steril filtriertem Kulturüberstand, Außenmembranvesikel sowie mit abgetöteten Bakterien vorgenommen.

#### **4.4.1. Charakterisierung der Zytotoxizität der UTI89 $\Delta$ galU-Mutante**

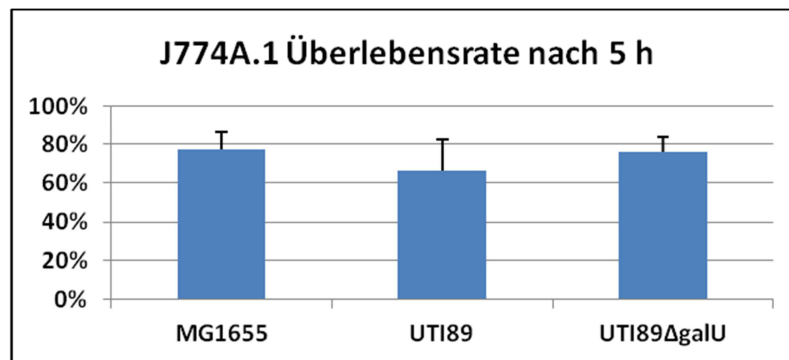
Wie beschrieben könnte ein potentieller Unterschied der Zytotoxizität von Mutante und Wildtyp-Bakterium einen Einfluss auf die *in vitro* Infektionsversuche haben (siehe 4.3.4.). Deshalb wurde auch für den UTI89 $\Delta$ galU-Stamm ein Vergleich der Zytotoxizität mit dem Wildtyp-Stamm, nach der bereits beschriebenen Methode, unter Benutzung des „Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability“ Tests, durchgeführt (Abb. 21).

Die mittlere Überlebensrate der Makrophagen war bei UTI89 $\Delta$ galU mit 76% etwa 10% höher als beim Wildtyp-Stamm, bei dem sie 66% betrug. Der ermittelte Unterschied wies allerdings keine Signifikanz auf, so dass sich zusammenfassend die Zytotoxizität des UTI89 Wildtyps offenbar nicht entscheidend von der der UTI89 $\Delta$ galU-Mutante unterschied. Ausgehend von der annähernd

#### 4. Ergebnisse

---

gleichen Überlebensrate der Makrophagen, sollte die Zytotoxizität der verwendeten Stämme keinen Einfluss auf die drastischen Unterschiede der Immunantwort haben. Weiterhin zeigte die Mutante *UTI89ΔgalU* auf Blutagarplatten eine vergleichbar starke  $\beta$ -Hämolyse-Zone wie der Wildtyp-Stamm

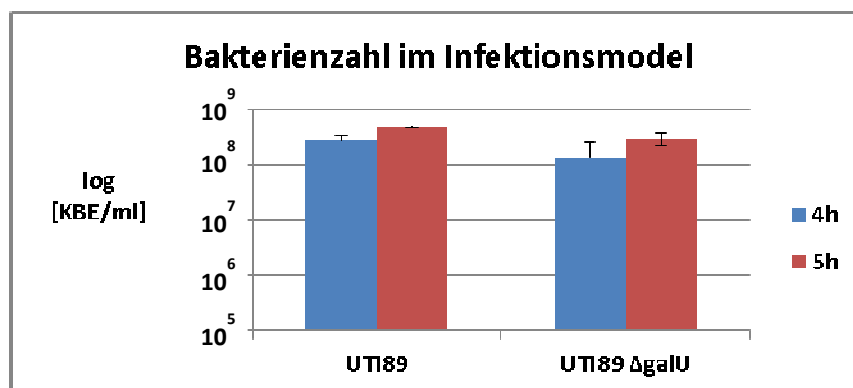


**Abbildung 21: J774A.1 Überlebensrate bei Infektion mit *UTI89ΔgalU***

Überlebensrate von J774A.1 Makrophagen, die mit den *E. coli*-Stämmen MG1655, UTI89 oder *UTI89ΔgalU* für 5 h co-inkubiert wurden. Die mit dem „Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability“ Test bestimmten Raten sind prozentual angegeben in Vergleich zu nicht infizierten Proben (100 %).

#### 4.4.2. Vergleich der bakteriellen Überlebensraten im Infektionsmodell

Die Bakterienzahl im Makrophagen-Infektionsmodell wurde sowohl von UTI89 als auch von *UTI89ΔgalU* nach 4 h und 5 h Co-Inkubation mit J774A.1 Makrophagen ausgehend von einer infektiösen Dosis von 50 Bakterien pro Makrophagen bestimmt. Die initiale Bakterienzahl von  $2,9 \times 10^7$  KBE/ml stieg bei UTI89 auf  $4,7 \times 10^8$  KBE/ml und bei *UTI89ΔgalU* auf  $2,9 \times 10^8$  KBE/ml nach 5 h Co-Inkubationsdauer an (Abb. 22). Die Bakterienzahl war demnach bei beiden Stämmen um etwa eine Log-Stufe angestiegen. Somit konnte weder nach 4 h noch nach 5 h ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

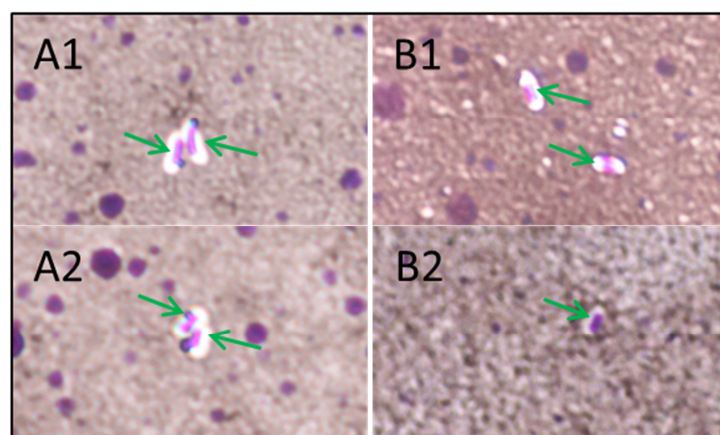


**Abbildung 22: Bakterienzahl von UTI89 $\Delta galU$  im Infektionsmodell**

Bakterienzahl (KBE/ml) der Stämme UTI89 und UTI89 $\Delta galU$  nach 4 h und 5 h Co-Inkubation mit J774A.1 Makrophagen bei einer initialen MOI von 50 KBE pro Makrophagen.

#### 4.4.3. Analyse der Kapsel von UTI89 $\Delta galU$

Die Bildung einer Kapsel bei UTI89 $\Delta galU$  wurde wie oben beschrieben durch die Anfertigung und Mikroskopie eines Tuschepräparats überprüft. Mit dieser Färbemethode konnte sowohl bei UTI89 als auch bei UTI89 $\Delta galU$  eine etwa gleich starke Ausbildung einer Kapsel festgestellt werden (Abb. 23). Daher ist davon auszugehen, dass die Deletion des Gens *galU* die Kapselbildung nicht beeinträchtigt.



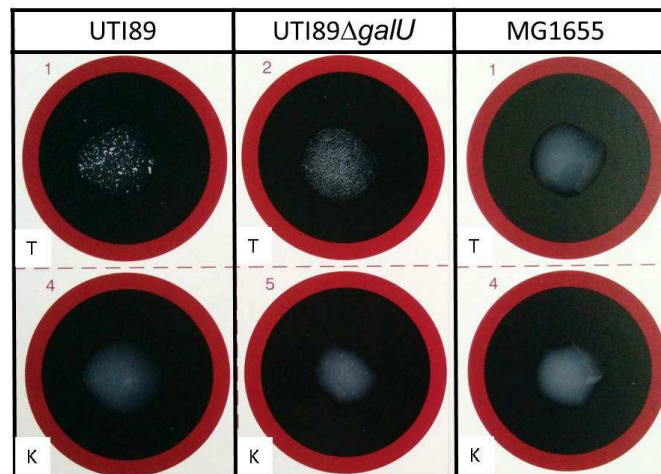
**Abbildung 23: Kapselfärbung von UTI89 $\Delta galU$**

Tuschepräparat, bei 1000x Vergrößerung, zur Darstellung der Kapsel der Stämme UTI89 (A1 + A2) und UTI89 $\Delta galU$  (B1 + B2). Die Kapsel (grüne Pfeile) ist als ein durchscheinender, das Bakterium (pink) umgebender Hof erkennbar.

#### 4. Ergebnisse

---

Zusätzlich wurde die Ausprägung des K1-Polysaccharid-Antigens beim Stamm UTI89 $\Delta galU$  mithilfe des Wellcogen<sup>TM</sup> Latex-Agglutinationstest überprüft (siehe 4.2.4.). Bei der UTI89 $\Delta galU$ -Mutante war, wie beim UTI89 Wildtyp, eine deutliche Verklumpung zu sehen (Abb. 24). Das zeigt, dass die Mutante ebenso eine Kapsel bildet, welche das K1-Antigen enthält.



**Abbildung 24: Latex-Agglutinationstest mit UTI89 $\Delta galU$**

Wellcogen<sup>TM</sup> Latex-Agglutinationstest mit den Stämmen UTI89 (K1), UTI89 $\Delta galU$  und MG1655 (K12). Felder, die mit „T“ markiert wurden, enthalten die Testlösung und Felder, die mit „K“ markiert wurden eine Kontrolllösung, die zur Negativkontrolle dient. Bei Stämmen mit dem K1-Antigen ist eine deutliche Verklumpung nach Vermengung mit der Testlösung zu sehen, ansonsten verbleibt die Testlösung milchig, wie die Kontrolllösung. Die Mutante UTI89 $\Delta galU$  zeigte, wie der Wildtyp-Stamm UTI89, eine deutliche Verklumpung, welche eine Ausprägung des K1-Antigens demonstriert.

#### 4.4.4. Analyse der Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen mittels Biolog<sup>TM</sup>-Untersuchungen

Die Deletion des Gens *galU* beeinflusst den Zuckermetabolismus des Bakteriums und kann deshalb auch Einfluss auf andere Stoffwechselprozesse nehmen. Daher wurde der Kohlenstoffmetabolismus von UTI89 $\Delta galU$  mit der Biolog<sup>TM</sup>-Methode analysiert, um Hinweise auf weitere Defizite zu erhalten. Wie bei UTI89 $\Delta purL$  wurden die Platten PM1 und PM2A verwendet (siehe 4.3.5.).

Bei der Biolog<sup>TM</sup>-Analyse wurden elf Substrate gefunden, bei denen die Stoffwechselaktivität maximal 50% der Stoffwechselrate des Wildtyp-Stammes betrug. Von diesen Substraten wurde eines mit weniger als 30% im bakteriellen Stoffwechsel metabolisiert, während bei sieben

keinerlei Metabolismus mehr festgestellt wurde (Tab. 7). Durch Komplementation der *galU*-Deletion mit dem Plasmid pWKS30-*galU* konnten sechs der Substrate, die ein totales Stoffwechseldefizit aufwiesen, wieder mit einer Aktivität von über 50% verwertet werden. Bei drei weiteren Substraten war nur eine geringfügige Komplementation der Stoffwechselaktivität von unter 50% messbar. Zusätzlich konnten die beiden Substrate Monomethylsuccinat und L-Threonin von der Komplementante UTI89 $\Delta$ *galU* + pWKS30-*galU* im Gegensatz zur Mutante UTI89 $\Delta$ *galU* und zum Wildtyp UTI89 gar nicht mehr verwertet werden.

Um den Einfluss des Vektors pWKS30 zu überprüfen, wurde der Stamm UTI89 $\Delta$ *galU* + pWKS30 verwendet. Dieser Stamm zeigte bei den sechs Substraten, die erfolgreich komplementiert wurden (Aktivität > 50%), eine Stoffwechselaktivität von unter 30%. Das bestätigte, dass die Komplementation durch das eingebrachte *galU*-Gen und nicht durch den Vektor bedingt ist. Die restlichen vier Substrate, die nicht oder nur schwach komplementiert werden konnten, wiesen bei der Vektor-Kontrolle eine Aktivität zwischen 11% und 56% auf. Das zeigte wiederum, dass die Komplementation hier nicht erfolgreich war, da der Vektor bereits die Stoffwechselaktivität des Stammes beeinflusste.

Überraschend war eine starke Verwertung von L-Galactonsäure- $\gamma$ -Lacton durch die Komplementante, die weder beim Wildtyp noch bei der Mutante auftrat. Da dieser Funktionsgewinn auch bei der Vektor-Kontrolle auftrat, konnte dieser Effekt auf den Vektor pWKS30 zurückgeführt werden.

#### 4. Ergebnisse

**Tabelle 7: Biolog<sup>TM</sup> Analyse von UTI89 $\Delta$ galU**

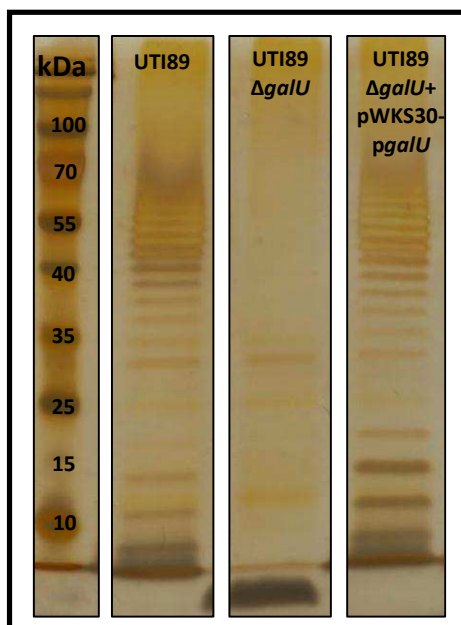
Charakterisierung des Kohlenstoffmetabolismus von UTI89 $\Delta$ galU, UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30-pgalU und UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30 durch Biolog<sup>TM</sup> Untersuchungen. Es sind sämtliche Substrate aufgeführt, bei denen die UTI89 $\Delta$ galU-Mutante eine Stoffwechselrate von maximal 50% im Vergleich zum Wildtyp hatte. Diejenigen, bei denen die Stoffwechselaktivität maximal 30% betrug wurden orange und diejenigen mit 0% rot hervorgehoben. Substrate die bei der Mutante UTI89 $\Delta$ galU mit dem Komplementationsplasmid pWKS30-pgalU eine Aktivität von unter 50% aufwiesen sind gelb markiert.

Substrat	UTI89 $\Delta$ galU	UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30- pgalU	UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30	Platte
D-Galactose	0%	69%	0%	PM1
D-Alanin	0%	50%	14%	PM1
L-Glutamat	0%	35%	29%	PM1
D-Melibiose	0%	55%	18%	PM1
$\alpha$ -Methyl-D-Galactosid	0%	56%	0%	PM1
Lactulose	0%	65%	29%	PM1
Glycolsäure (Hydroxyessigsäure)	38%	36%	56%	PM1
L-Threonin	50%	0%	30%	PM1
Monomethylsuccinat	43%	0%	11%	PM1
3-O- $\beta$ -D-Galacto-pyranosyl-D-Arabinose	26%	43%	6%	PM2A
$\beta$ -Methyl-D-Galactosid	0%	75%	0%	PM2A

#### 4.4.5. Veränderungen in der Lipopolysaccharid-Struktur von UTI89 $\Delta$ galU

Die durch GalU-katalysierte Herstellung von UDP-Glucose ist ein wichtiger Schritt für die Biosynthese von Oligosacchariden. Dadurch übt eine Deletion dieses Gens Einfluss auf die Zusammenstellung des LPS aus, so wie es für *E. coli* K12 (Genevaux et al., 1999), aber auch für *V. cholerae* (Nesper et al., 2001) und *Lactococcus lactis* (Boels et al., 2001) beschrieben wurde. Deshalb wurde das LPS von UTI89, UTI89 $\Delta$ galU und UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30-pgalU isoliert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt, welches anschließend einer Silberfärbung unterzogen wurde (Abb. 25).





**Abbildung 25: Silberfärbung des UTI89 $\Delta$ galU LPS**

Silberfärbung des isolierten, auf einem SDS-Gel (13,5%) aufgetrennten LPS der Stämme UTI89, UTI89 $\Delta$ galU und UTI89 $\Delta$ galU + pWKS30-pgalU. In der ersten Spur ist der „Pageruler Protein Ladder“ Größenmarker mit Größenangaben in kDa aufgetragen.

Beim LPS des Stamms UTI89 $\Delta$ galU war deutlich zu erkennen, dass die charakteristische Leiter der O-PS Seitenkette zwischen ca. 35 kDa bis 70 kDa fehlt. Beim Wildtyp-Stamm und auch bei der mit pWKS30-pgalU komplementierten Mutante war das O-PS deutlich sichtbar. Bei UTI89 $\Delta$ galU waren einige Banden zu sehen, die vom LPS-Core stammten. Zusammenfassend betrachtet ist die LPS-Struktur von UTI89 $\Delta$ galU deutlich verändert, da kein O-PS mehr vorhanden ist. Der Stamm besitzt eine raue LPS-Struktur, was auch durch die Morphologie und Beschaffenheit der Kolonien auf LB-Platten erkennbar war. Die Bakterienkolonien von UTI89 $\Delta$ galU erschienen trocken, mit leicht ausgefranzten Rändern, außerdem waren sie bei Berührung mit einer Impföse brüchig. Im Gegensatz dazu bildeten der Wildtyp und die komplementierte Mutante schleimig, glänzende Kolonien mit glattem Rand.

#### 4.4.6. Herstellung verschiedener Lipopolysaccharid-Mutanten

Da es sich bei *galU* um ein Metabolismusgen handelt, das nicht nur die korrekte LPS-Struktur, sondern auch andere Eigenschaften des Bakteriums beeinflusst, war der nächste Schritt die

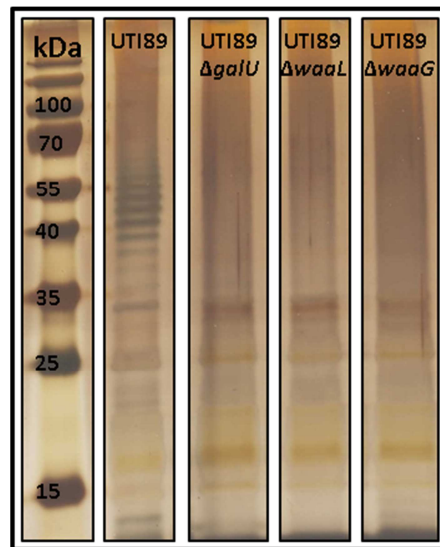
Herstellung von Mutanten, die zwar eine raue LPS-Struktur besitzen, für die aber eine Störung weiterer zellulärer Prozesse ausgeschlossen werden konnte.

### **4.4.6.1. Knockout der O-Polysaccharid Ligase WaaL und der LPS $\alpha$ 1,3-Glycosyltransferase WaaG**

Als geeigneter Weg zur Erschaffung von UTI89-Mutanten mit rauem LPS wurde die Deletion von Genen gewählt, die direkt am Aufbau des LPS beteiligt sind. Dafür bietet sich insbesondere das Gen *waaL* an. Dieses Gen kodiert für die O-Antigen Ligase WaaL, die das O-PS mit dem LPS-Core verknüpft. Eine weitere, raue LPS-Mutante sollte durch die Deletion der LPS  $\alpha$  1,3-Glycosyltransferase WaaG, welche für den Aufbau des Äußeren LPS-Cores essentiell ist, erstellt werden (Raetz and Whitfield, 2002). Beide Gene wurden durch die  $\lambda$  Red Rekombinase Technik erfolgreich aus dem Genom von UTI89 durch das Einbringen einer Kanamycin (*waaL*) oder Chloramphenicol (*waaG*) Resistenzkassette deletiert. Sowohl die korrekte Insertion als auch die folgende Entfernung der Resistenzkassette durch die FLP Rekombinase wurden durch PCR-basierte Kontrollen überprüft.

### **4.4.6.2. Überprüfung der LPS Struktur von UTI89 $\Delta$ *waaL* und UTI89 $\Delta$ *waaG***

Bereits die Morphologie der Kolonien von UTI89 $\Delta$ *waaL* und UTI89 $\Delta$ *waaG* deuteten auf eine raue LPS-Struktur hin, da sie trocken und brüchig erschienen. Ob die Deletion aber tatsächlich eine LPS-Struktur mit fehlendem O-PS zur Folge hatte wurde wieder durch Silberfärbungen des isolierten und elektrophoretisch aufgetrennten LPS der Mutanten überprüft (Abb. 26).



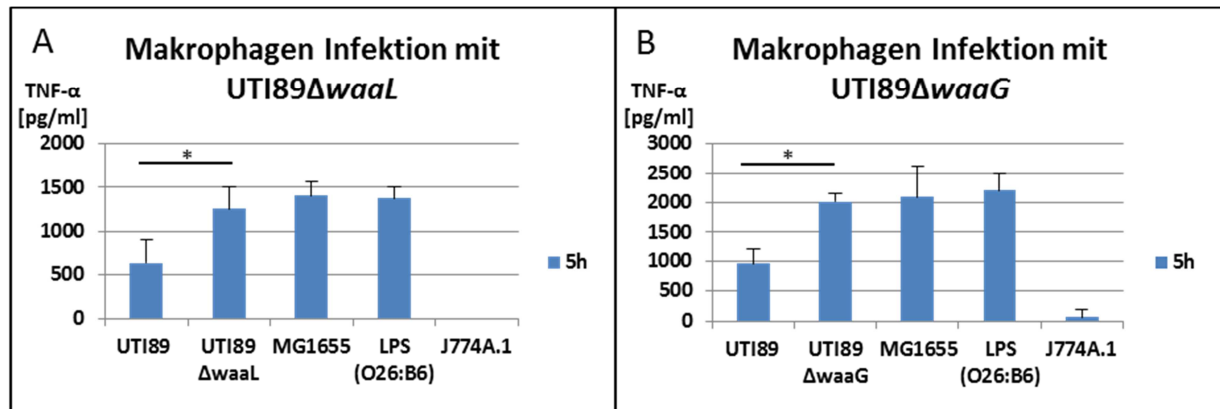
**Abbildung 26: Silberfärbung des LPS verschiedener O-PS Mutanten**

Silberfärbung der isolierten LPS Varianten der Stämme UTI89, UTI89 $\Delta galU$ , UTI89 $\Delta waaL$  und UTI89 $\Delta waaG$ , aufgetrennt auf einem SDS-Gel (13,5%). Die Größenangaben des aufgetragenen „Pageruler Protein Ladder“ Standards (ersten Spur) sind in kDa.

Die Silberfärbung verdeutlicht, dass dem LPS von UTI89 $\Delta waaL$  und UTI89 $\Delta waaG$  die charakteristische O-PS Leiter bei 35 kDa bis etwa 70 kDa fehlt. Generell war die Struktur der beiden LPS-Varianten dem LPS von UTI89 $\Delta galU$  in der Silberfärbung sehr ähnlich. Es lässt sich also festhalten, dass durch den Knockout der Gene *waaL* oder *waaG* die erwünschte, raue LPS-Struktur im Stamm UTI89 erzeugt wurde, die der LPS-Struktur von UTI89 $\Delta galU$  ähnelte.

#### 4.4.6.3. Zytokin-Antwort von UTI89 $\Delta waaL$ und UTI89 $\Delta waaG$ im Infektionsmodell

Nach der Überprüfung der LPS-Struktur wurde sowohl die UTI89 $\Delta waaL$  als auch die UTI89 $\Delta waaG$ -Mutante im Makrophagen-Infektionsmodell auf die hervorgerufene Zytokin-Antwort geprüft. Für diese Infektion wurde, wie zuvor, eine MOI von 50 verwendet und die Zytokin-Werte nach 5 h Co-Inkubationszeit quantifiziert (Abb. 27).



**Abbildung 27: Zytokin-Antwort auf Co-Inkubation mit UTI89ΔwaaL und UTI89ΔwaaG**

TNF-α-Konzentration (pg/ml) im Makrophagen-Infektionsmodell, bei einer MOI von 50, nach einer Co-Inkubationszeit von 5 h. Es wurden Versuche mit die Bakterienstämme UTI89, MG1655, UTI89ΔwaaL (A) und UTI89ΔwaaG (B) sowie von unbehandelten und LPS (O26:B6; 500 ng/ml) stimulierten Makrophagen durchgeführt. Die TNF-α-Konzentration war sowohl bei Infektionen mit UTI89ΔwaaL ( $P = 0,015$ ) als auch bei UTI89ΔwaaG ( $P = 0,003$ ) signifikant höher als bei solchen mit UTI89, was durch Sterne gekennzeichnet wurde.

Sowohl bei Infektion mit UTI89ΔwaaL ( $P = 0,015$ ) als auch mit UTI89ΔwaaG ( $P = 0,003$ ) war die Zytokin-Antwort im Vergleich zu Infektionen mit UTI89 signifikant erhöht. Die Höhe der TNF-α-Ausschüttung war vergleichbar zu der Kontrollinfektion mit MG1655 oder der Stimulation der Makrophagen durch LPS (O26:B6). Die Zytokin-Konzentrationen entsprach jeweils etwa dem doppelten der Antwort gegenüber UTI89, was einen deutlichen Verlust der immunmodulierenden Fähigkeit durch die Deletion der Gene *waaL* und *waaG* zeigt.

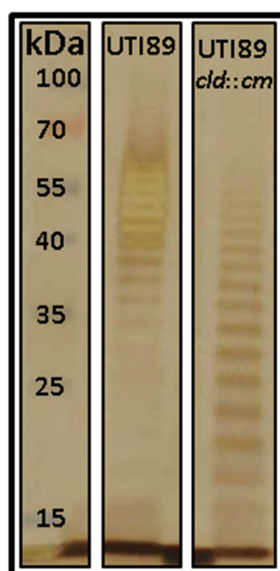
#### 4.4.6.4. Herstellung einer LPS-Längenpolymorphismus-Mutante

Nicht nur ein kompletter Verlust des O-PS sondern auch eine Veränderung der O-PS Längenstruktur stellt eine Modifikation des LPS dar, welche die Immunmodulation der Bakterien beeinflussen könnte. Das Gen *cld* kodiert für einen Regulator der O-PS Seitenkettenlänge des LPS (Chen et al., 2006). Durch eine Deletion dieses Gens kann statt einer kompletten Entfernung, eine Veränderung der O-PS Struktur herbeigeführt werden. Hierfür wurde erneut die  $\lambda$  Red Rekombinase-Technologie genutzt, um das *cld*-Gen durch eine Chloramphenicol-Resistenzkassette zu ersetzen, wodurch die Mutante UTI89*cld::cm* entstand. In diesem Fall war es allerdings auch nach mehreren Versuchen nicht möglich, die Resistenzkassette wieder zu entfernen, so dass die Folgenden Untersuchungen mit dem Chloramphenicol-resistenten Stamm durchgeführt wurden. Die Silberfärbung des UTI89*cld::cm* LPS zeigte eine deutliche

#### 4. Ergebnisse

---

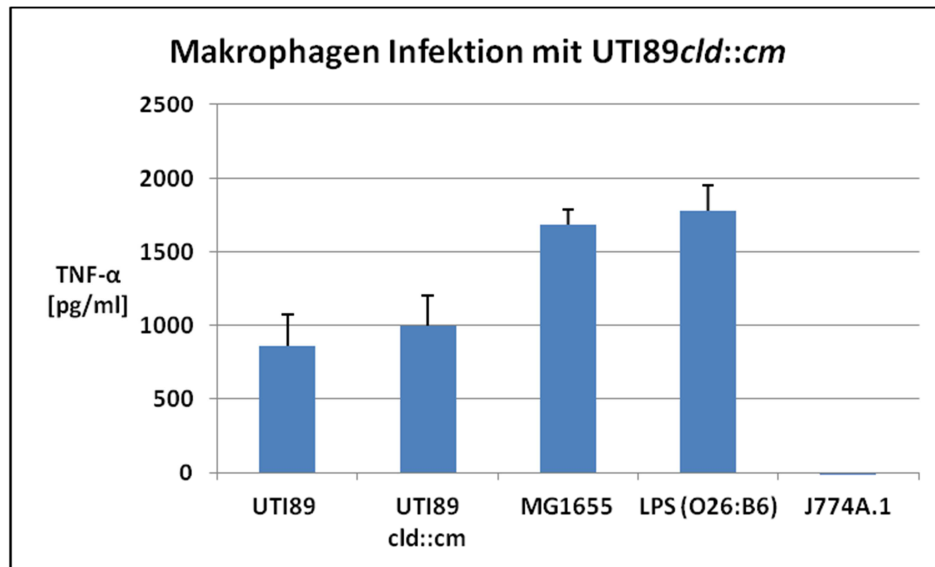
Veränderung der O-PS Seitenkettenstruktur. So war die charakteristische O-PS-Leiter beim Stamm UTI89 vor allem zwischen 35 kDa und 70 kDa zu finden, während sie beim Stamm UTI89*cld::cm* zwischen 15 kDa und 55 kDa lag. Beim Stamm UTI89*cld::cm* dominierten also im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm LPS-Varianten mit einer kurzen O-PS Seitenkette (Abb. 28).



**Abbildung 28: Silberfärbung des LPS von UTI89*cld::cm***

Silberfärbung des isolierten und auf einem 13,5% SDS-Gel aufgetragenen LPS der Stämme UTI89 und UTI89*cld::cm*. Die Größenangaben des „Pageruler Protein Ladder“ Standards (Spur 1) sind in kDa.

Die LPS-Längenpolymorphismus-Mutante wurde im Anschluss an die O-PS-Charakterisierung auch im Makrophagen-Infektionsmodell auf die verursachte Zytokin-Ausschüttung getestet. Es konnten dabei allerdings keine Unterschiede in der Immunantwort der Makrophagen gegenüber UTI89*cld::cm* im Vergleich zu UTI89 festgestellt werden (Abb. 29). Durch die Verkürzung der O-PS-Seitenkette wurde also zusammenfassend die Immunmodulation der Bakterien nicht merklich beeinträchtigt.



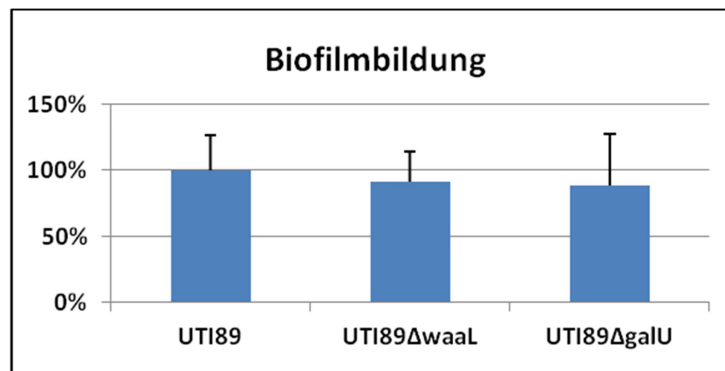
**Abbildung 29: Makrophagen Infektion mit UTI89cld::cm**

TNF- $\alpha$  Konzentrationsbestimmung nach 5 h Co-Inkubation von J774A.1 Makrophagen mit UTI89 oder UTI89cld::cm (jeweils MOI: 50). Als Kontrollen wurden Co-Inkubation mit *E. coli* MG1655, eine Stimulation der Makrophagen mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) und unbehandelte Makrophagen verwendet.

#### 4.4.7. Untersuchung der Biofilmbildung

Die Bildung von Biofilmen der Mutanten UTI89 $\Delta galU$  und UTI89 $\Delta waaL$  wurde, wie bereits beschrieben, durch eine Färbung mit Kristallviolett nach 24 h quantifiziert. Die Stärke des gebildeten Biofilms wurde anschließend prozentual in Verhältnis zur Biofilmbildung des Wildtyp-Stamm berechnet.

Dabei konnte sowohl bei UTI89 $\Delta galU$  als auch bei UTI89 $\Delta waaL$  eine Reduzierung der mittleren Biofilmstärke um ca. 10% festgestellt werden, die aber keine statistische Signifikanz aufwies (Abb. 30). Es lässt sich also festhalten, dass durch den Verlust des O-PS keine schwerwiegende Beeinträchtigung der Bildung von Biofilmen bei UTI89 festzustellen war.



**Abbildung 30: Biofilmbildung von UTI89ΔwaaL und UTI89ΔgalU**

Quantifizierung der Biofilmbildung der Stämme UTI89, UTI89ΔwaaL und UTI89ΔgalU durch Kristallviolett-Färbung nach 24 h. Die Stärke der Biofilmbildung bei UTI89 wurde auf 100% normiert und die prozentuale Stärke des Biofilms der Mutanten entsprechend berechnet.

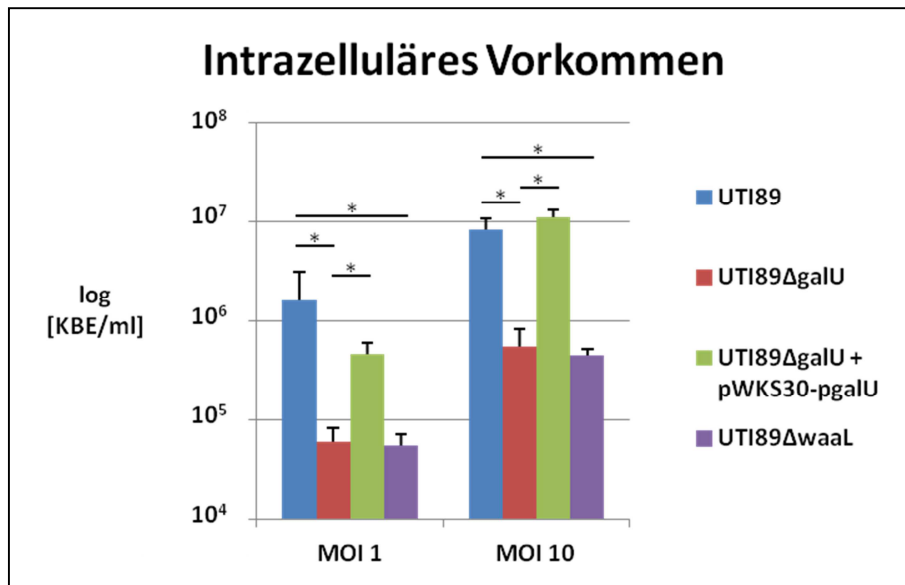
#### 4.4.8. Analyse des intrazellulären Vorkommens

Es ist von UPEC bekannt, dass sie nicht nur intrazellulär überleben, sondern dort sogar intrazelluläre Kolonien (IBC; engl.: „intracellular bacterial communities“) formen können (Anderson et al., 2003). Deshalb wurde untersucht, ob die Gen-Deletion von *galU* oder *waaL* einen Einfluss auf die Zahl der intrazellulär vorkommenden Keimzahlen bei Co-Inkubation mit J774A.1 Makrophagen hat. Dafür wurde die Methode des Gentamicin-Protektionsversuchs gewählt, bei der alle extrazellulären Bakterien im Zellkulturansatz durch Zugabe von Gentamicin abgetötet werden. Die intrazellulären Bakterien sind durch die Zellmembran der Wirtszelle vor dem nicht membrangängigen Antibiotikum geschützt.

Im Gentamicin-Protektionsversuch wurde die intrazellulären Keimzahlen der Stämme UTI89ΔgalU und UTI89ΔwaaL jeweils nach 3 h Co-Inkubation mit J774A.1 Makrophagen bei einer MOI von 1 und 10 bestimmt. Die Gen-Deletion von *galU* und *waaL* im *E. coli* UTI89 führten dabei zu einer signifikanten ( $P < 0,001$ ) Reduktion der intrazellulären Keimzahlen von mehr als einer Log-Stufe bei beiden verwendeten MOI. Die intrazellulären Keimzahlen der komplementierten Mutante UTI89ΔgalU + pWKS30-pgalU entsprachen wieder denen des Wildtyp-Stamms UTI89 und waren im Vergleich zur Mutante UTI89ΔgalU signifikant ( $P < 0,001$ ) um etwa eine Log-Stufe erhöht (Abb. 31). Bei jedem Gentamicin-Protektionsversuch wurde zur Kontrolle jeweils eine Bestimmung der gesamten KBE ohne Gentamicinzugabe durchgeführt und die Bakterienstämme untereinander verglichen. Ohne die Zugabe von

#### 4. Ergebnisse

Gentamicin waren nach 3 h Co-Inkubation mit den Makrophagen keine Unterschiede in der jeweiligen Gesamtzahl der KBE festzustellen. Zur Berechnung der Signifikanzen durch den Student's t-Test wurden sämtliche Messwerte einer logarithmischen Transformation unter Verwendung des dekadischen Logarithmus ( $\log_{10}$ ) unterzogen.



**Abbildung 31: Intrazelluläres Vorkommen von UTI89ΔwaaL und UTI89ΔgalU**

Gentamicin-Protektionsversuche zur Quantifizierung intrazellulärer Bakterienzahlen der Stämme UTI89, UTI89ΔgalU, UTI89ΔgalU + pWKS30-pgalU und UTI89ΔwaaL in J774A.1 Makrophagen. Die Co-Inkubationszeit der Bakterien und Makrophagen betrug 3 h bei einer MOI von 1 oder 10. Signifikante Unterschiede ( $P < 0,001$ ) in der intrazellulären, bakteriellen Keimzahlen sind durch einen Stern markiert.

#### 4.4.9. Stimulation der Makrophagen mit isoliertem Lipopolysaccharid

Die Charakterisierung der LPS-Struktur der erstellten UTI89ΔgalU-Mutante offenbarte ein Fehlen des O-PS. Weiterhin wurde bei dieser sowie bei den Mutanten UTI89ΔwaaL und UTI89ΔwaaG, denen exklusiv das O-PS bzw. das O-PS und Teile des LPS-Cores fehlen, ein Verlust der Immunmodulation festgestellt. Aus diesem Grund wurden Makrophagen mit LPS stimuliert, das mit verschiedenen Methoden isoliert wurde, um potentielle Unterschiede in der Immunogenität der LPS-Varianten zu beschreiben. Das LPS wurde zum einen durch Heißwasser-Phenol-Extraktion (Komaniecka et al., 2010) von der Gruppe von Prof. Dr. Otto Holst (Forschungszentrum Borstel) in einer hoch reinen Form isoliert. Zum anderen wurde das LPS in

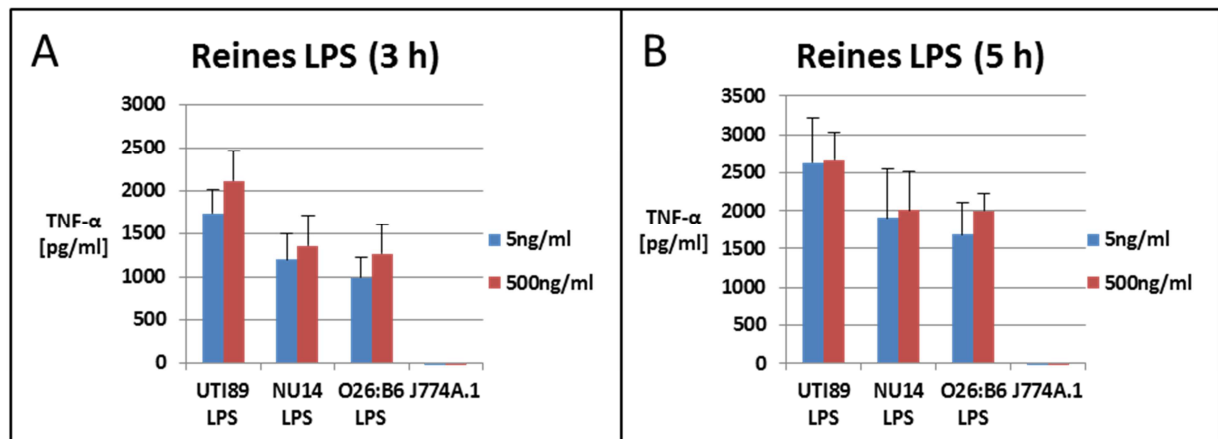


## 4. Ergebnisse

einer „rohen“ Form - mit gebundenen zellulären Faktoren - durch Einsatz der LPS-bindenden ENDOTRAP® HD Säule gewonnen.

### 4.4.9.1. Stimulation mit hoch reinem Lipopolysaccharid

Unser Kooperationspartner Prof. Dr. Otto Holst (Forschungszentrum Borstel) stellte uns hoch aufgereinigtes LPS der Stämme UTI89 und NU14 zur Verfügung. Dieses LPS wurde verwendet, um J774A.1 Makrophagen zu stimulieren und potentielle Unterschiede der Immunogenität zwischen diesem LPS und dem *E. coli* O26:B6 LPS festzustellen, das als Positivkontrolle in den vorgangenen Versuchen benutzt wurde (Abb. 32).



**Abbildung 32: Stimulation der Makrophagen mit reinem LPS**

Stimulation von J774A.1 Makrophagen mit isoliertem, hoch reinem LPS. Die Makrophagen wurden mit LPS der UPEC-Stämme UTI89 und NU14 sowie mit *E. coli* O26:B6 LPS in Konzentrationen von 5 ng/ml und 500 ng/ml versetzt. Die TNF- $\alpha$ -Konzentration der Überstände wurden anschließend nach 3 h (A) und 5 h (B) mittels ELISA quantifiziert.

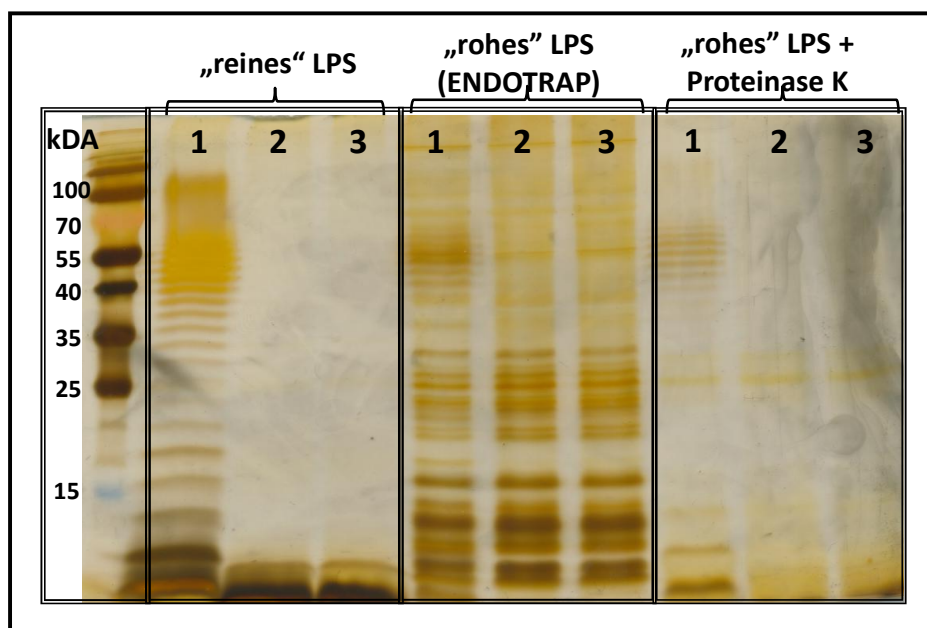
Die Makrophagen antworteten auf das applizierte LPS aller drei Stämme mit einer hohen TNF- $\alpha$ -Ausschüttung. Diese war sowohl nach 3 h als auch nach 5 h bei den Konzentrationen von 5 ng/ml und 500 ng/ml bei NU14 LPS und O26:B6 LPS vergleichbar hoch. Nach 5 h wurde bei einer Zugabe von 500 ng/ml LPS beider LPS-Varianten eine TNF- $\alpha$ -Konzentration von bis zu 2.000 pg/ml gemessen. Bei Zugabe des hoch reinen LPS des Stamms UTI89 übertraf die gemessene TNF- $\alpha$ -Konzentration nach 3 h und 5 h sogar die durch NU14 LPS und O26:B6 LPS hervorgerufenen Werte. Interessanterweise konnte also das reine UPEC-LPS eine sehr hohe

Zytokin-Antwort der J774A.1 Makrophagen hervorrufen, die nicht weniger ausgeprägt war als die durch O26:B6-LPS hervorgerufene.

### **4.4.9.1. Stimulation mit über ENDOTRAP® HD angereichertem Lipopolysaccharid**

Die Stimulationsversuche mit reinen LPS zeigten, dass isoliertes UPEC-LPS auch hoch simulierend war. Dieses Ergebnis steht allerdings im Kontrast zu den Ergebnissen der Infektionsversuche mit vitalen Bakterien, in denen der Verlust des O-PS eine signifikant erhöhte Zytokin-Antwort zur Folge hatte. Bei der Isolationsmethode für reines LPS werden harsche Bedingungen verwendet, um sämtliche Proteine zu zerstören und abzutrennen. Da es allerdings bekannt ist, dass Faktoren wie z.B. Hämolysin mit dem LPS interagieren (Mansson et al., 2007), könnte ein solches Zusammenspiel zwischen LPS und zellulären Faktoren durch aufgereinigtes LPS nicht dargestellt werden.

Deshalb entwickelten wir eine Methode, um LPS mit potenziell daran gebundenen Faktoren aus dem Bakterienlysate eines nicht denaturierenden Zellaufschlusses anzureichern. Hierfür wurden die Bakterien mit einer French Press mechanisch aufgeschlossen und das Lysat steril filtriert. Anschließend wurde das LPS in der Probe über die ENDOTRAP® HD Säule durch Affinitätschromatographie angereichert und mit daran gebundenen zellulären Faktoren eluiert. Die Färbungen der auf diese Weise aufgereinigten „rohen“ LPS-Proben zeigten viele zusätzliche Banden, wobei trotzdem die O-PS-Leiterstruktur des Wildtyp-Stamms gut zu erkennen war. Nachdem die Proben mit Proteinase K verdaut wurden, waren die zusätzlichen Banden auf dem SDS-Gel verschwunden. Das zeigt, dass es sich bei diesen Banden um Proteine handelt, die mit dem LPS isoliert wurden (Abb. 33).

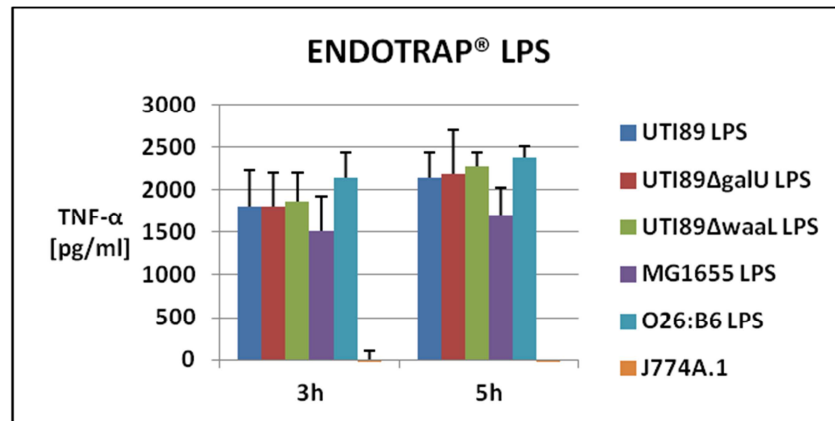


**Abbildung 33: Silberfärbung des LPS verschiedener Aufreinigungsmethoden**

Silberfärbung verschiedener isolierter LPS-Varianten der Stämme UTI89 (1), UTI89Δ*galU* (2) und UTI89Δ*waaL* (3). Das LPS wurde entweder als „reines“ LPS nach der von Kulesus et al. beschriebenen Methode (Kulesus et al., 2008) oder als „rohes“ LPS über die ENDOTRAP® HD Säule isoliert. Das „rohe“ LPS wurde auch einem Verdau mit Proteinase K unterzogen, um die Präsenz von Proteinen in den Proben zu zeigen. Die Größenangaben des „Pageruler Protein Ladder“ Standards sind in kDa.

Die gewonnen „rohen“ LPS-Proben der Stämme UTI89, MG1655, UTI89Δ*galU* und UTI89Δ*waaL* wurden mit Hilfe des Purpald Reagenz vermessen und zur Stimulation von Makrophagen in einer Konzentration von 500 ng/ml verwendet (Abb. 34).

Sowohl nach 3 h als auch nach 5 h konnte kein Unterschied in der TNF-α-Antwort der Makrophagen gegenüber den „rohen“ LPS-Proben des UTI89 Wildtyps und der beiden Mutanten festgestellt werden. Die Antwort war in allen drei Fällen recht stark und übertraf sogar die der „rohen“ LPS-Proben von *E. coli* K12 MG1655. Nach 5 h wurden Zytokin-Konzentrationen von über 2.000 pg/ml TNF-α mit Proben aller drei Stämme erreicht. Da zuvor gezeigt wurde, dass in den nicht denaturierten, „rohen“ LPS-Proben zelluläre Proteine vorhanden sind, konnte in diesem Versuchsansatz kein Einfluss auf die Zytokin-Ausschüttung durch LPS assoziierte, zelluläre Faktoren nachgewiesen werden.



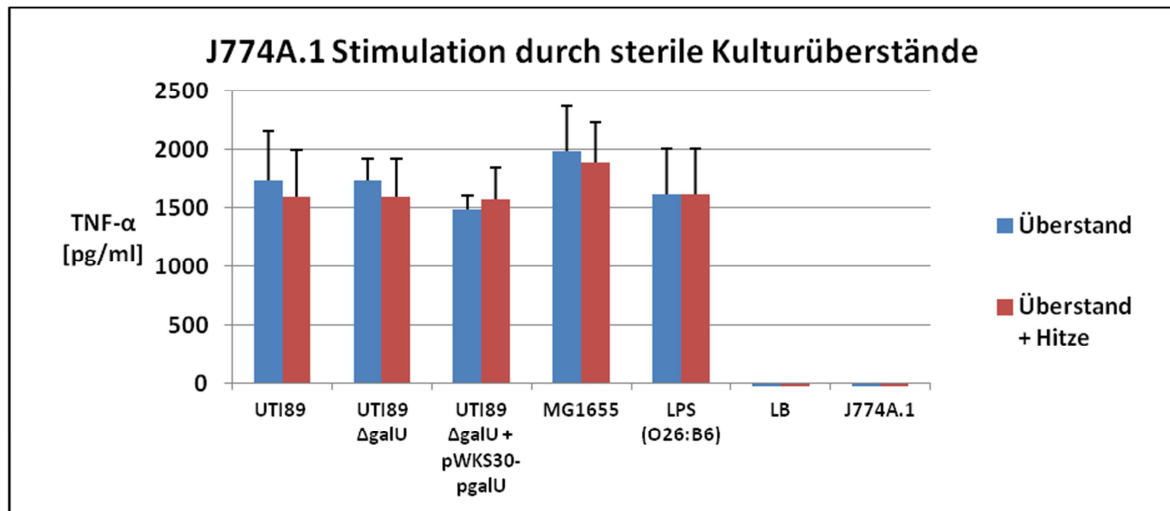
**Abbildung 34: TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bei Makrophagen-Stimulation mit „rohem“ LPS**

Stimulation von J774A.1 Makrophagen mit „rohem“, über ENDOTRAP® HD Säulen angereichertem LPS. Das „rohe“ LPS inklusive daran gebundener, zellulärer Faktoren der Stämme UTI89, UTI89ΔgalU, UTI89ΔwaaL und MG1655 wurden in einer Konzentration von 500 ng/ml zu den Makrophagen gegeben. Die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung wurde anschließend mittels ELISA nach 3 h und 5 h im Überstand quantifiziert.

### 4.4.10. Makrophagen Stimulation mit steril filtriertem Kulturüberstand

Bakterien können auch durch die Sekretion von Effektoren Einfluss auf Zielzellen nehmen (Saier, Jr., 2006). Ob der UPEC-Stamm UTI89 auf die Immunantwort der Makrophagen durch sezernierte Proteine beeinflusst, sollte in Experimenten mit bakteriellem Kulturüberstand geklärt werden. Dafür wurden die Stämme UTI89, UTI89ΔgalU, UTI89ΔgalU + pWKS30-pgalU und MG1655 in LB Medium kultiviert und anschließend der Kulturüberstand steril filtriert und in einem Volumen, das einer MOI von 50 entspricht, auf die Makrophagen gegeben. Außerdem wurde jeweils eine Charge des sterilen Überstands gekocht, um potentielle Proteineffektoren zu zerstören und somit deren potentiellen Einfluss zu quantifizieren.

Nach einer Inkubationszeit von 5 h war bei Verwendung der Überstände von UTI89, UTI89ΔgalU und UTI89ΔgalU + pWKS30-pgalU kein Unterschied in der Zytokin-Antwort der J774A.1 Makrophagen zu erkennen (Abb. 35). Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen dieser Ansätze waren jeweils mit Werten von ca. 1.500 pg/ml bis 2000 pg/ml TNF- $\alpha$  sehr hoch, unabhängig von einer vorausgegangen Hitzebehandlung der Überstände. Zusammengefasst konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass der UPEC-Stamm UTI89 Effektoren in seine Umgebung sezerniert, die die Immunantwort der Makrophagen dämpfen.



**Abbildung 35: Makrophagen-Stimulation mit sterilem Kulturüberstand**

Stimulation von J774A.1 Makrophagen mit steril filtrierten Überstand der Stämme UTI89, UTI89 $\Delta galU$ , UTI89 $\Delta galU$  + pWKS30-pgalU und MG1655. Die sterilen Kulturüberstände wurden entweder unbehandelt oder hitzebehandelt verwendet. Sie wurden in einem Volumen äquivalent zu einer MOI von 50 zugegeben und die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung nach 5 h mittels ELISA quantifiziert. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Makrophagen oder Makrophagen, zu den O26:B6 LPS (500ng/ml) oder LB Medium gegeben wurde.

### 4.4.11. Versuche mit Außenmembranvesikeln

Gramnegative Bakterien produzieren während ihres Wachstums Außenmembranvesikel (OMV), die eine Vielzahl von Funktionen übernehmen können (Li et al., 1998). Auf diesen OMVs befinden sich neben Lipopolysacchariden auch Phospholipide und Außenmembranproteine (Zhou et al., 1998). Somit bilden OMV zu einem gewissen Grad die Oberfläche des jeweiligen Bakteriums ab.

In den folgenden Versuchen sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, ob die Produktion von OMVs des Stamms UTI89 durch die Deletion des *galU*- oder *waaL*-Gens beeinflusst wird. Überdies sollte geprüft werden, ob OMVs der Mutante eine stärkere Zytokin-Ausschüttung im Makrophagenmodell verursachen als OMVs des Wildtyps.

#### **4.4.11.1. Bestimmung der Konzentration von Außenmembranvesikel in der UTI89 Kultur durch FACS-Analyse**

Die Menge der produzierten OMVs wurde direkt aus dem Überstand der wachsenden Bakterienkultur nach jeweils 3 h und 5 h bestimmt. Zur Quantifizierung der OMV-Konzentration

## 4. Ergebnisse

---

wurde die Durchflusszytometrie nach der von Wieser et al. beschriebenen Methode verwendet (Wieser et al., 2014).

Die Konzentration der gemessenen OMVs lag beim Wildtyp-Stamm UTI89 bei ca. 2.500 OMV/ $\mu$ l nach 3 h und ca. 6.700 OMV/ $\mu$ l nach 5 h (Tab. 8). Die Stämme UTI89 $\Delta galU$  und UTI89 $\Delta waaL$  wiesen nach derselben Wachstumszeit eine vergleichbare OMV-Konzentration im Kulturmedium auf, so dass kein Einfluss der Deletion der Gene *galU* und *waaL* auf die Freisetzung von OMVs festgestellt werden konnte.

**Tabelle 8: OMV Konzentrationen**

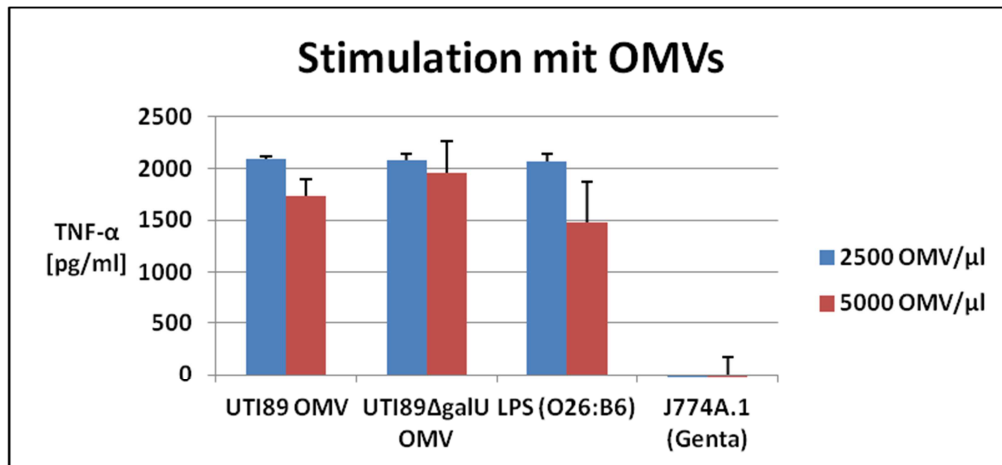
Konzentrationsbestimmung von OMVs in LB Medium nach 3 h und 5 h Wachstum der Stämme UTI89, UTI89 $\Delta galU$  und UTI89 $\Delta waaL$ .

Zeit	UTI89	UTI89 $\Delta galU$	UTI89 $\Delta waaL$
3 h	2578 OMV/ $\mu$ l	2283 OMV/ $\mu$ l	2490 OMV/ $\mu$ l
5 h	6763 OMV/ $\mu$ l	6783 OMV/ $\mu$ l	6700 OMV/ $\mu$ l

### 4.4.11.2. Stimulation der Makrophagen mit Außenmembranvesikeln

Die Immunogenität der OMVs wurde im nächsten Schritt im Makrophagenmodel getestet. Dafür wurden OMVs durch Ultrazentrifugation geerntet und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Diese OMVs wurden anschließend den Makrophagen in einer Endkonzentration von 2.500 OMV/ $\mu$ l und 5.000 OMV/ $\mu$ l zugesetzt und die TNF- $\alpha$ -Antwort nach 5 h quantifiziert. Höhere OMV-Endkonzentrationen wurden in dem Makrophagenmodel nicht getestet, da bei der OMV-Ernte keine höhere Ausbeute erzielt werden konnten.

Die Makrophagen antworteten auf die jeweilige Zugabe der OMVs mit einer starken Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . Außerdem konnte bei der Zytokin-Antwort kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, unabhängig davon, ob die OMVs von UTI89 oder UTI89 $\Delta galU$  stammten (Abb. 36).



**Abbildung 36: Stimulation der Makrophagen mit Außenmembranvesikel**

Stimulation von J774A.1 Makrophagen mit isolierten OMVs der Stämme UTI89 und UTI89Δ*galU*. Die OMVs wurden in einer Endkonzentration von 2.500 OMVs/μl (blaue Balken) und 5.000 OMVs/μl (rote Balken) zu den Makrophagen gegeben und die TNF-α-Antwort nach 5 h mittels ELISA quantifiziert. In beiden Ansätzen diente 500 ng/ml LPS (O26:B6) als Positivkontrolle und mit Gentamicin (10 μl/ml) versetzte Makrophagen als Negativkontrolle.

#### 4.4.12. Co-Inkubation der Makrophagen mit inaktivierten Bakterien

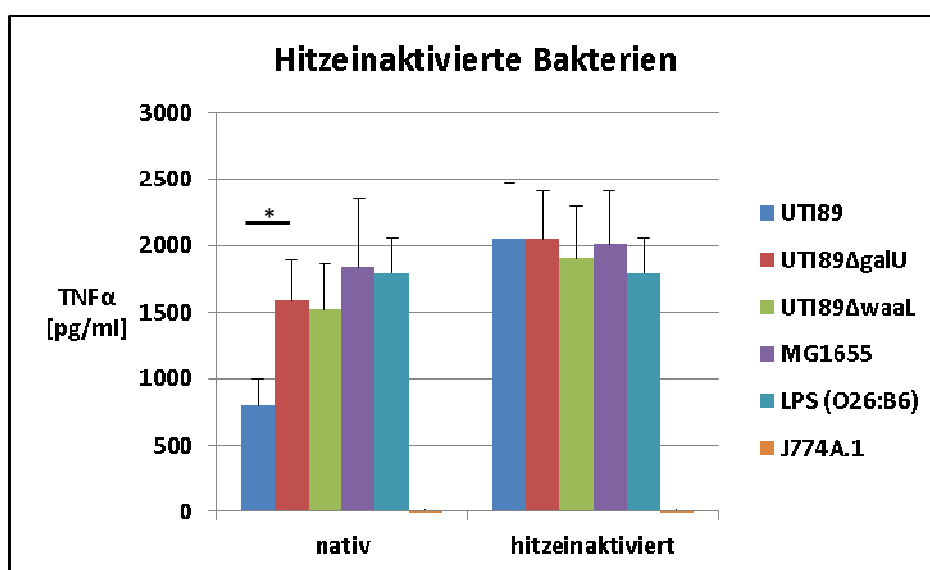
Nach Versuchen mit reinem und „rohem“ LPS, sowie mit OMVs, wurden als Nächstes die immunmodulierenden Eigenschaften von abgetöteten Bakterien analysiert. Inaktivierte Bakterien sind deshalb besonders interessant, weil das LPS noch nativ in der Zellmembran eingebettet ist und dadurch den Makrophagen in einer natürlichen Konformation angeboten wird. Für die Inaktivierung der Bakterien wurden zwei verschiedene Methoden gewählt, zum einen die Hitzeinaktivierung und zum anderen die Inaktivierung mit Formalin. Bei der ersten Methode ist mit einer Zerstörung der Integrität des Bakteriums zu rechnen, während durch die Fixierung mit Formalin die Struktur der äußeren Hülle des Bakteriums weitestgehend intakt bleibt. Bei beiden Methoden sollte dennoch das LPS in der Zellmembran des Bakteriums in seiner nativen Konfiguration verankert bleiben.

##### **4.4.12.1. Co-Inkubation mit hitzeinaktivierten Bakterien**

Für die Stimulationsversuche mit hitzeinaktivierten Bakterien wurde die Bakterienkultur geteilt und eine Charge durch Kochen bei 100°C abgetötet. Lebende und abgetötete Bakterien wurden

im Anschluss in parallelen Ansätzen in einer MOI von 50 zu den J774A.1 Makrophagen gegeben (Abb. 37).

Bei Infektionen mit nativen Bakterien war, wie bereits beschrieben, ein signifikanter Unterschied zwischen UTI89 und UTI89 $\Delta galU$  zu erkennen. Im Gegensatz dazu war die Zytokin-Antwort gegenüber den gekochten Bakterien mit ca. 2.000 pg/ml TNF- $\alpha$  bei allen verwendeten Stämmen etwa gleich stark ausgeprägt.



**Abbildung 37: Co-Inkubation der J774A.1 Makrophagen mit hitzeinaktivierten Bakterien**

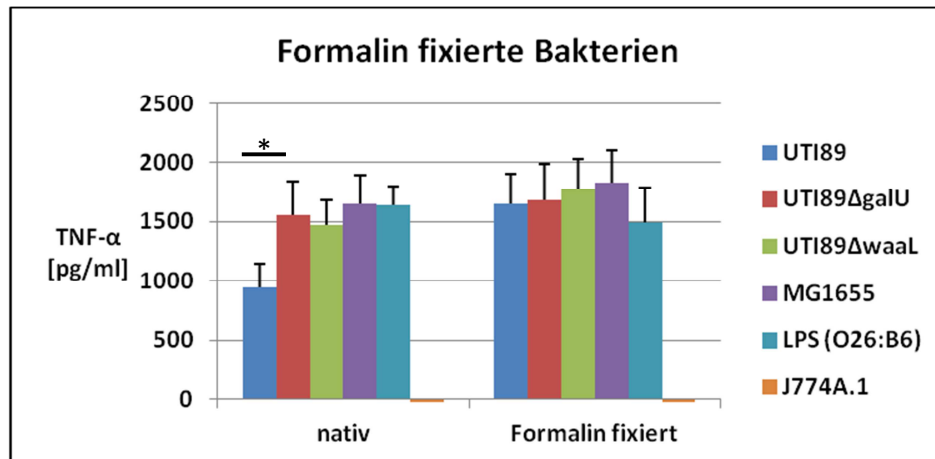
Die Bakterien der Stämme UTI89, UTI89 $\Delta galU$ , UTI89 $\Delta waaL$  und MG1655 wurden in einer MOI von 50 entweder nativ oder hitzeinaktiviert zu den Makrophagen gegeben. Die Quantifizierung der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung erfolgte nach 5 h mittels ELISA. Unbehandelte sowie mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimulierte Makrophagen dienten als Kontrolle. Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen der Proben mit nativen UTI89 und nativen UTI89 $\Delta galU$  waren signifikant ( $P < 0,001$ ) unterschiedlich, was mit einem Sternchen markiert wurde.

Somit verliert der Wildtyp-Stamm UTI89 durch die Hitzebehandlung seine Fähigkeit zur Beeinflussung der Immunantwort und verursacht eine ähnlich hohe Zytokin-Ausschüttung wie ein *E. coli* K12 oder die beiden Mutanten UTI89 $\Delta galU$  und UTI89 $\Delta waaL$ .

### 4.4.12.2. Co-Inkubation mit Formalin-fixierten Bakterien

Infektionen mit Formalin-fixierten Bakterien folgten einem analogen Versuchsablauf wie jene mit hitzeinaktivierten Stämmen. Statt mit Hitze wurden die Bakterien für eine halbe Stunde mit 3,7% Formalin abgetötet und nach 3 Waschschritten mit den Makrophagen co-inkubiert (Abb. 38).





**Abbildung 38: Co-Inkubation von J774A.1 Makrophagen und Formalin-inaktivierten Bakterien**

Bakterien der Stämme UTI89, UTI89ΔgalU, UTI89ΔwaaL und MG1655 wurden für 5 h in einer MOI von 50 den Makrophagen zugesetzt. Anschließend wurde die TNF-α-Konzentration des Überstands durch ELISA ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Proben und mit 500 ng/ml LPS (O26:B6) stimulierte Makrophagen. Der signifikante Unterschied ( $P = 0,012$ ) zwischen den Proben mit nativen UTI89 und nativen UTI89ΔgalU wurde durch ein Sternchen markiert.

Interessanterweise verlor der UTI89 Wildtyp-Stamm auch durch das Abtöten mit Formalin seine Fähigkeit, die TNF-α-Ausschüttung der Makrophagen abzuschwächen. Das ist insofern bemerkenswert, da die äußere Hülle der Bakterien bei der Formalin-Behandlung intakt bleibt und das UTI89-LPS mit dem kompletten O-PS auf natürliche Weise in der Außenmembran präsentiert bleibt. Alle mit Formalin-fixierten Stämme riefen TNF-α-Konzentrationen von über 1.600 pg/ml im Infektionsversuch hervor und waren somit gleichermaßen stark stimulierend für die Makrophagen.

### **5. Diskussion**

Der Harntrakt ist ein, unter nicht pathologischen Bedingungen, steriler Bereich, in dem viele, sowohl passive als auch aktive Abwehrmechanismen gegen eine bakterielle Besiedlung vorhanden sind. UPEC sind allerdings gut angepasste und hoch spezialisierte Pathogene, die es durch die Expression verschiedener Pathogenitätsfaktoren bewerkstelligen, in diesem anspruchsvollen Habitat Fuß zu fassen (Bien et al., 2012). Die UPEC-Infektion selbst ist dabei ein komplexer Prozess, der akute und chronische Phasen durchläuft kann und sich sowohl extrazellulär wie auch intrazellulär abspielt (Hannan et al., 2012). Eine breite Palette von Pathogenitätsfaktoren ermöglicht UPEC die Anbindung an das Wirtsgewebe, die Gewinnung von Eisen, die Schädigung des Blasenepithels und auch die Beeinflussung oder Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes (Wiles et al., 2008; Yamamoto, 2007). UPEC-Isolate sind aber überraschenderweise sehr heterogen, sodass beispielsweise verschiedene Strategien der Immunmodulation bekannt sind. Das Zusammenspiel der jeweils vorhandenen Pathogenitätsfaktoren ist daher besonders wichtig für eine erfolgreiche Infektion (Hannan et al., 2012; Sivick and Mobley, 2010).

Viele Studien über die Entstehung von HWIs durch UPEC beschreiben verschiedene Pathomechanismen (Yamamoto, 2007). Dennoch ist gerade im Bereich der molekularen Funktionsweise noch einiges unbekannt, bedingt durch die Vielzahl und Komplexität der Pathogenitätsfaktoren. In Zeiten zunehmender Antibiotikaresistenzen ist es daher besonders wichtig, weitere Details der UPEC-Pathogenitätsmechanismen zu identifizieren (Hannan et al., 2012), um mögliche neue Therapieansätze entwickeln zu können.

Diese Arbeit befasst sich deshalb insbesondere mit der Frage, welche molekularen und genetischen Faktoren für UPEC wichtig sind, um das Immunsystem zu ihren Gunsten manipulieren zu können und somit eine erfolgreiche Infektion zu etablieren. In früheren Studien wurde in UPEC bereits eine neue Gruppe TIR-Domänen beinhaltender Proteine (Tcp) beschrieben, welche die MyD88 abhängige Signalkaskade von TLRs blockieren können (Cirl et al., 2008). Diese Proteine kommen nicht nur bei *E. coli* (TcpC), sondern auch bei anderen bakteriellen Spezies, wie etwa *Brucella melitensis* (TcpB), vor (Cirl et al., 2008).

Untersuchungen über die Verbreitung von TcpC zeigten, dass einer Vielzahl von UPEC-Isolaten das Protein fehlt. So wurde TcpC beispielsweise nur bei etwa 50% von Pyelonephritis-assoziierten Isolaten nachgewiesen (Schubert et al., 2010). Über dies konnte beobachtet werden, dass viele TcpC-negative UPEC-Isolate - wie beispielsweise *E. coli* UTI89 - dennoch die TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Makrophagen *in vitro* verringern (Prof. Sören Schubert – mündliche Mitteilung). Das bedeutet, dass diese Isolate mittels bislang unbekannter Pathomechanismen in der Lage sind, die Immunantwort zu dämpfen. Aus diesem Grund widmete sich diese Arbeit dem *E. coli* Stamm UTI89, um die Frage zu klären, welche Mechanismen zur Immunmanipulation durch TcpC-negative *E. coli* beitragen.

### **5.1. UTI89 verringert aktiv die Immunantwort von Makrophagen**

In der vorliegenden Arbeit demonstrierten wir zuerst, dass der UPEC Stamm UTI89 im Vergleich zu dem nicht pathogenen *E. coli* K12-Stamm MG1655 bei einer Infektion von J774A.1 Makrophagen eine signifikant verringerte Zytokin-Ausschüttung zur Folge hat. Diese Reduktion der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung kann entweder auf einem passiven Prozess, verursacht durch eine schlechtere Wahrnehmung der UPEC durch die Makrophagen, oder einem aktiven Prozess, bedingt durch eine UPEC-vermittelte Manipulation der Makrophagen, basieren. Um diese Frage zu klären, stimulierten wir die Makrophagen mit *E. coli*-LPS vor der Co-Inkubation mit den Versuchsstämmen. Da dennoch eine signifikante Reduktion der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung durch *E. coli* UTI89, aber nicht bei *E. coli* MG1655 zu beobachten war, gehen wir von einer aktiven Immunmodulation durch den UPEC Stamm aus.

Daten anderer Arbeitsgruppen weisen auch auf die Immunmodulationsfähigkeit von UPEC hin. So wurde etwa eine verringerte Ausschüttung von IL-6 und IL-8 durch Blasenepithelzellen, in Folge einer Infektion durch UPEC, im Vergleich zu Infektionen mit *E. coli* K12 beobachtet (Billips et al., 2007; Hilbert et al., 2008; Hunstad et al., 2005). Auch hier bestand die Immunmodulation fort, trotz einer LPS-Vorstimulation der Blasenepithelzellen (Hunstad et al., 2005). Weiterhin wurde ein ExPEC-Stamm untersucht, der die Zytokin-Antwort (TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-1 $\beta$ ) von Makrophagen senken kann (Selvaraj and Prasadarao, 2005). Um einen ausgeprägten immunmodulierenden Effekt zu erhalten, war in unseren Experimenten eine relativ hohe Infektionsdosis von 50 Bakterien pro Makrophagen notwendig. Allerdings benötigten auch

andere Arbeitsgruppen hohe MOIs, z.B. eine MOI von mindestens 40 Bakterien pro Zelle (Hunstad et al., 2005), um aussagekräftige Ergebnisse in ihren immunologischen Studien zu erhalten. Eine MOI 50 entsprach einer Keimlast von ca.  $4 \times 10^6$  KBE/ml, eine solche hohe Bakterienzahl ist bei einem HWI durchaus möglich wie eine Studie zeigt, bei der die Hälfte der untersuchten HWI-Patienten Keimzahlen von mehr als  $1 \times 10^6$  KBE/ml aufwies (Caron et al., 2015).

### **5.2. Die Gene *purL* und *galU* verhindern Immunmodulation durch UTI89**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein gerichteter Knockout der Gene *purL* und *galU* zu einem Verlust der Immunmodulation des UPEC-Stamms UTI89 an J774A.1 Makrophagen *in vitro* führt. Dies wird durch die signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Ausschüttung der Makrophagen deutlich, die eine Infektion der Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm auslöst. Die erfolgreiche, plasmidale Komplementation der beiden Gen-Deletionen führte jeweils zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps und verifiziert somit den beobachteten Effekt. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der Transposon-Mutagenese des UPEC-Stammes NU14, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Dort führten Transposon-Insertionen in die Gene *galU* und *purL* ebenfalls zu einer Reduktion der IL-6-Zytokin-Antwort *in vitro* (Christiane Hoffmann, nicht publizierte Daten). Somit konnte der Verlust der Immunmodulation durch die Deletion der Gene *galU* und *purL* in zwei UPEC-Stämmen in jeweils unabhängigen *in vitro* Studien bestätigt werden.

Unsere Studien bringen zum ersten Mal die beiden Gene *purL* und *galU* mit der Fähigkeit zur Immunmodulation von UPEC in Verbindung. Über *galU* ist bekannt, dass eine *galU*-Mutante in *Francisella tularensis*, dem Erreger der Tularämie (einer Zoonose bei Nagern und Hasenartigen), eine stark verminderte Virulenz aufweist und eine deutlich stärkere proinflammatorische Zytokin-Antwort des Wirts verursacht (Jayakar et al., 2011).

Studien, die eine *purL*-Mutante in anderen bakteriellen Spezies untersuchten, konnten ebenfalls eine Verbindung zwischen der Virulenz der Bakterien und *purL* aufzeigen. So war beispielsweise die benötigte mittlere letale Dosis von *purL*-Mutanten der Spezies *Francisella tularensis* um mehrere Log-Stufen erhöht (Kadzhaev et al., 2009). Auch bei *Brucella abortus* konnte durch eine Transposon-Insertion, sowohl in *purL* als auch in anderen Purinbiosynthese-Genen, gezeigt

werden, dass Stämme, die Defizite in der Purinbiosynthese besitzen, eine deutlich attenuierte Virulenz im Mausmodell aufweisen (Alcantara et al., 2004).

### **5.3. Purin-Stoffwechseldefizit verhindert Wachstum / Immunmodulation im Makrophagen-Infektionsmodell**

Nachdem der Verlust der Immunmodulation *in vitro*, durch Ausschalten des *purL*-Gens im Stamm UTI89, gezeigt wurde, erstellten wir zur Validierung dieser Ergebnisse eine weitere Purinbiosynthese-Mutante. Dafür deletierten wir das Gen *purM*, dessen Genprodukt PurM den auf PurL nachfolgenden Schritt der Purinbiosynthese katalysiert. Mit der entsprechenden Mutante UTI89 $\Delta$ *purM* konnten wir anschließend sicherstellen, dass der Verlust der Immunmodulation mit dem Verlust der *de novo* Purinbiosynthese zusammenhängt und nicht etwa durch die Lokalisation der Deletion im Genom oder einem möglichen polaren Effekt bedingt ist. Eine derartige Beeinflussung kann ausgeschlossen werden, da die Gene *purL* und *purM* etwa 75 kb im Genom des *E. coli* UTI89 voneinander entfernt liegen. Anschließend begannen wir mit der phänotypischen Charakterisierung der Purinbiosynthese-Mutante UTI89 $\Delta$ *purL*. Dabei wurde das Wachstumsverhalten in Vollmedium, die Biofilmbildung, die Kapselbildung, die Struktur des LPS, das Hämolyse-Verhalten und die Zytotoxizität der Mutante mit dem Wildtyp verglichen, ohne dabei einen Unterschied im Phänotyp zu erkennen.

Erst die Analyse des Kohlenstoff-Stoffwechsels mit Hilfe des Biolog<sup>TM</sup>-Testverfahrens konnte Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante aufzeigen. Die Mutante UTI89 $\Delta$ *purL* hatte bei 23 der getesteten Nährstoffquellen eine verringerte Stoffwechselrate von mindestens 50%, darunter besaßen sieben sogar eine Stoffwechselrate von weniger als 30%. Interessanterweise waren diese sieben Substrate allesamt Saccharide, was auf ein Defizit der Zuckerverwertung durch die *purL* Gen-Deletion schließen lässt. Die Verfügbarkeit bestimmter Saccharide hat einen potentiellen Einfluss auf mehrere Pathogenitätsfaktoren, wie etwa dem Aufbau des LPS (Raetz and Whitfield, 2002) oder der Bildung von Kapseln und Biofilmen (Wu et al., 2012). Allerdings konnten wir bei der Analyse dieser Pathogenitätsfaktoren keine offensichtlichen Unterschiede zwischen UTI89 $\Delta$ *purL* und dem Wildtyp feststellen. Außerdem ist es nicht möglich zu unterscheiden, ob die Zuckerverwertung durch die *purL* Gen-Deletion gestört wird oder ob die Bakterien ihren Purinmangel mit dem angebotenen Saccharid-Substrat nicht überbrücken können und somit ihren

Metabolismus generell einstellen. Die Tatsache, dass alle Substrate zumindest in geringem Maß metabolisiert werden konnte, spricht aber gegen ein generelles Defizit der UTI89 $\Delta$ *purL*-Mutante beim Stoffwechsel dieser Saccharide.

Die komplementierten *galU*- und der *purL*-Mutanten wiesen Veränderungen im Stoffwechsel auf, die weder in Mutante noch im Wildtyp-Stamm feststellbar waren: Eine neu gewonnene Fähigkeit zur Verwertung von L-Galactonsäure- $\gamma$ -Lacton, (beiden Komplementanten), ein drastischer Aktivitätsverlust im Metabolismus von Monomethylsuccinat und L-Threonin (*purL* Komplementation). Diese Auffälligkeiten konnten den verwendeten Vektor-Kontrollen zugeschrieben werden. Nur im Fall der Verwertung von L-Galactonsäure- $\gamma$ -Lacton durch UTI89 $\Delta$ *purL* + pMCL200-*ppurL* konnte die Vektor-Kontrolle keinen Aufschluss geben, da die generelle Stoffwechselaktivität des verwendeten Stammes sehr gering war. Da für den pWKS30-Vektor aber ein Zusammenhang gezeigt werden konnte, ist nahe liegend, dass es sich um einen analogen Mechanismus handelt.

Die interessanteste Beobachtung machten wir allerdings, als wir die Zellzahlen von UTI89 und UTI89 $\Delta$ *purL* nach fünfstündiger Co-Inkubation mit J774A.1 verglichen. Die KBE/ml der UTI89 $\Delta$ *purL*-Mutante waren nur geringfügig höher als die eingesetzte Konzentration, wohingegen die KBE/ml des Wildtyps um mehr als eine Log-Stufe angewachsen waren. Aufgrund dieser Beobachtung untersuchten wir das Wachstum von UTI89 $\Delta$ *purL* in dem für die Infektionsversuche der Makrophagen benötigten Medium (RPMI, DMEM). Dabei wurde offensichtlich, dass die Purinbiosynthese-Mutanten in diesem Purin-armen Medium, im Gegensatz zum Vollmedium, anfänglich geringfügiges Wachstum zeigten und die Zellzahl dann stagnierte. Das Wachstum von UTI89 $\Delta$ *purL* konnte sowohl durch plasmidale Komplementation als auch durch die Supplementierung des Mediums mit IMP, einem späten Metabolit der Purin-Biosynthese, wiederhergestellt werden. Außerdem ließen sich durch Zugabe von IMP bei den Makrophagen-Infektionen ebenfalls das Wachstum und die Immunmodulation von UTI89 $\Delta$ *purL* auf das Niveau des Wildtyps bringen. Das komplette Einstellen des Wachstums der Purinbiosynthese-Mutanten in einer Purin-armen Umgebung, spricht dafür, dass essentielle Stoffwechselprozesse gestört sind. Weil Purine eine bedeutende Rolle bei der Synthese von Nukleotiden, den Grundbausteinen der DNA und RNA, spielen (Zhang et al., 2008), wirkt sich eine Purin-Knappheit auf die Transkription und somit die Proteinbiosynthese der Bakterien aus. Dadurch wird wahrscheinlich die Expression wichtiger Virulenzfaktoren von UTI89 $\Delta$ *purL* verringert oder komplett verhindert. Die Purinbiosynthese-Mutanten wurden allerdings in einem

hohen Überschuss (MOI 50) zu den Makrophagen gegeben und sind auch am Ende der Co-Inkubationszeit von fünf Stunden vital. Sie können aber interessanterweise trotzdem die Zytokin-Ausschüttung nicht vermindern. Diese Beobachtung spricht dafür, dass für die Verringerung der Immunantwort aktive Fähigkeiten und nicht passive Eigenschaften, wie etwa die Bildung einer Kapsel oder die Zusammenstellung der äußeren Hülle des UPEC, von Bedeutung sind. Es ist davon auszugehen, dass passive Virulenzfaktoren zum Zeitpunkt der Überführung in die Purin-arme Umgebung bereits voll ausgeprägt sind. Deshalb sollten sie durch die Einstellung der Proteinbiosynthese und des Wachstums nicht so stark betroffen sein, wie beispielsweise die aktive Synthese und Sekretion eines Toxins. Welche Virulenzfaktoren letztendlich konkret eingeschränkt und für den Verlust der Immunmodulation von UTI89 $\Delta purL$  verantwortlich sind, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

### **5.4. LPS-Strukturänderung sind maßgeblich am Verlust der Immunmodulation von UTI89 $\Delta galU$ beteiligt**

Da wir einen Verlust der Immunmodulation des Stammes UTI89 im Makrophagen-Infektionsversuch durch eine Deletion des Gens *galU* festgestellt hatten, führten wir eine Charakterisierung des entsprechenden Stammes durch. Wir untersuchten mehrere Virulenzfaktoren, wie die Bildung von Kapseln und Biofilmen sowie die Zytotoxizität und das Hämolyse-Verhalten. Dabei war allerdings kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante festzustellen. Dass die Gen-Deletion von *galU* in UTI89 keinen Einfluss auf die Kapselbildung hatte, überraschte uns, da bereits für mehrere bakteriellen Spezies wie *Streptococcus pneumoniae* (Bonofiglio et al., 2005) und *Klebsiella pneumoniae* (Chang et al., 1996) ein Zusammenhang zwischen GalU und der Bildung einer Kapsel beschrieben wurde. Entweder kann der verwendete UPEC-Stamm seine Kapsel ohne die Verwendung von UDP-Glucose erstellen, oder die verwendete, Färbemethode war nicht sensitiv genug, um den Unterschied darzustellen. Wenn man allerdings in Betracht zieht, welche heterogene Gruppe alleine UPEC innerhalb der Spezies *E. coli* darstellen (Hannan et al., 2012), ist es durchaus möglich, dass das Gen *galU*, im Gegensatz zu anderen bakteriellen Spezies, keinen Einfluss auf die Kapselbildung von UTI89

nimmt. Außerdem konnte die Präsentation des K1-Kapselantigen bei der Mutante UTI89*galU* durch einen Latex-Agglutinationstest bewiesen werden.

Im Zuge der Charakterisierung von UTI89*ΔgalU* wurde ebenfalls der Kohlenstoff-Stoffwechsel, unter Verwendung der Biolog<sup>TM</sup>-Technik, analysiert. Dabei konnten elf Substrate ermittelt werden, bei denen UTI89*ΔgalU* ein Stoffwechseldefizit aufwies. Bei sieben dieser Substrate war keinerlei metabolische Aktivität festzustellen. Von diesen Substraten konnte die Stoffwechselaktivität bei sechs erfolgreich durch einbringen des Plasmids pWKS30-*pgalU* wiederhergestellt werden. Weiterhin konnten diese sieben Substrate keiner einheitlichen Stoffklasse zugeordnet werden, da sich darunter zwei Aminosäuren, drei Saccharide und zwei Substrate aus der Klasse der „kleinen Moleküle“ befanden. Dadurch ist es schwierig einen zugrundeliegenden, gemeinsamen Mechanismus zu finden. Möglicherweise wird die Aufnahme dieser Stoffe durch eine veränderte Oberflächenstruktur des Bakteriums unterbunden, da die *galU*-Gen-Deletion Zuckerstrukturen in der Zellwand von *E. coli* beeinträchtigen kann (Genevaux et al., 1999).

In der Literatur finden sich zahlreiche Informationen, die einen Einfluss der *galU*-Gen-Deletion auf die Struktur des LPS vermuten lassen (Boels et al., 2001; Genevaux et al., 1999; Nesper et al., 2001). Die Färbung des LPS von UTI89*ΔgalU* zeigte auch einen Verlust des O-PS, der durch plasmidale Komplementation behoben werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde aber bei der Spezies *Francisella tularensis* eine verminderte Virulenz und eine erhöhte Zytokin-Antwort, aber kein Verlust des O-PS als Folge einer Mutation des *galU*-Gens festgestellt (Jayakar et al., 2011). Um daher den Einfluss des O-PS von UTI89 auf die Immunmodulation von Makrophagen weiter zu analysieren, erstellten wir Mutanten, denen exklusiv LPS-Synthese Gene fehlen, ohne dass dadurch andere zelluläre Stoffwechselprozesse beeinträchtigt sind, wie es bei der *galU* Gen-Deletion der Fall ist. Diesen Mutanten fehlt entweder das O-PS (UTI89*ΔwaaL*) oder das O-PS und zusätzlich der äußeren LPS-Kern (UTI89*ΔwaaG*). Beide Mutanten verursachten im Makrophagen-Infektionsmodell eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Zytokin-Antwort, was ebenfalls den Verlust der Immunmodulation zeigt. Eine Mutation des O-PS-Längenverhältnisses bei der Mutante UTI89*cld::cm* hatte hingegen keine erhöhte Zytokin-Ausschüttung zur Folge. Das verdeutlicht weiterhin, solange das LPS ein O-PS besitzt, ist die Immunmodulation des UPEC nicht wesentlich beeinträchtigt, trotz einer veränderten Länge der O-PS Repetition. Das O-PS ist daher offenbar ein wichtiger Faktor für UPEC, um eine Manipulation der Immunantwort zu ermöglichen. Diese Daten sind im Einklang mit anderen Arbeitsgruppen, die *in vitro* bei



Blasenepithelzellen eine deutliche Erhöhung der IL-6 und IL-8 Antwort feststellen konnten, verursacht durch ein Fehlen des O-PS (Backhed et al., 2001; Billips et al., 2008; Hunstad et al., 2005). Unsere Daten komplettieren diese Erkenntnisse, indem wir zeigen, dass der Verlust des O-PS bei UPEC zusätzlich zu Blasenepithelzellen auch bei Makrophagen eine erhöhte Zytokin-Antwort zur Folge hat.

Interessanterweise kommen bei UPEC trotz der großen Heterogenität dieser Gruppe nur wenige O-Serotypen vor (Johnson, 1991). Diese wenigen O-Serotypen scheinen bei der Etablierung eines HWIs von Vorteil zu sein, was zusätzlich die Bedeutung des entsprechenden O-PS auf die Virulenz der UPEC herausstellt. Gemeinsam mit den publizierten Daten runden unsere Ergebnisse dieses Bild ab und unterstreichen die Relevanz des O-PS für UPEC, um gegen das Immunsystem des Wirts bestehen zu können.

Intrazelluläres Überdauern in Wirtszellen ist für UPEC eine wichtige Strategie, um der Immunantwort des Wirts zu entgehen und eine persistierende Infektion zu etablieren. An der Invasion der Bakterien sind verschiedene UPEC-Strukturen, wie das Adhäsin FimH (Martinez et al., 2000), aber auch Wirtszellstrukturen beteiligt, wie TLR4 (Chassin et al., 2008) oder  $\alpha$ 3- und  $\beta$ 1-Integrine (Eto et al., 2007). Nach dem Eindringen in die Zelle bilden UPEC IBCs und reproduzieren sich weiter im Zytoplasma der Wirtszelle. Für die Bildung von IBCs scheint insbesondere die Kapsel der UPEC ein relevanter Pathogenitätsfaktor zu sein (Anderson et al., 2010). Die Invasion und Persistenz von UPEC konnte bereits für mehrere Zelltypen wie Blasenepithelzellen (Anderson et al., 2003; Berry et al., 2009) oder Zellen der Nierengänge (Chassin et al., 2008; Pichon et al., 2009) gezeigt werden. Unsere Ergebnisse zeigen zusätzlich, dass UPEC auch in großer Zahl internalisiert in Makrophagen überdauern können ( $>1 \times 10^6$  KBE/ml bei einer MOI von 1 und  $5 \times 10^5$  Makrophagen). Die Anzahl dieser intrazellulär lebenden UPEC ist bei einer Deletion des *galU*-Gens signifikant um über eine Log-Stufe verringert. Wir vermuten, dass die Veränderung der Oberflächenstruktur, wie das Fehlen des O-PS, die Ursache für das verringerte intrazelluläre Vorkommen der Mutante UTI89 $\Delta$ *galU* ist, da sie keine *in vitro* nachvollziehbaren Wachstumsdefizite besitzt. Passend zu dieser Vermutung zeigten etwa Versuche mit Blasenepithelzellen, dass UPEC-LPS an der Invasion der Bakterien beteiligt ist (Schilling et al., 2001). Deswegen könnte der Verlust des O-PS beispielsweise die aktive Invasion der UPEC in die Makrophagen oder auch deren Überleben nach der Phagozytose erschweren. Diese Daten geben allerdings noch keinen Aufschluss darüber, zu welchem Grad die Bakterien aktiv in die Makrophagen einwandern oder von den Makrophagen phagozytiert werden

und im Zytosol überdauern. Daher kann auch keine Aussage getroffen werden, ob bei der Mutante UTI89 $\Delta galU$  die Invasionsrate, die intrazelluläre Überlebensdauer oder beides verringert ist. Diese interessanten Fragen können daher Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

### **5.5. LPS-Struktur nicht exklusiver Faktor der Immunmodulation**

Nachdem wir bei UTI89 $\Delta galU$ , UTI89 $\Delta waaL$  und UTI89 $\Delta waaG$  eine signifikant stärkere Immunantwort der Makrophagen durch den Verlust der O-PS-Seitenkette des O18-LPS zeigen konnten, stimulierten wir J774A.1 Makrophagen mit aufgereinigtem LPS. Bei der Verwendung von hoch reinem UPEC-LPS aus dem Labor von Prof. Dr. Otto Holst stellten wir überraschenderweise keinen Unterschied in der verursachten TNF- $\alpha$ -Ausschüttung fest. Somit ist das LPS der UPEC Stämme UTI89 und NU14 ebenso wie das des apathogenen *E. coli* Stamms O26:B6 in einer vergleichbaren Weise hoch immunstimulierend für Makrophagen. Über die Immunogenität von aufgereinigtem UPEC-LPS ist bekannt, dass es bei Blasenepithelzellen zwar eine Ausschüttung von IL-6 verursacht, diese aber bei intaktem O-PS gering ausfällt und die raue LPS-Form eine deutlich höhere Zytokin-Ausschüttung bewirkt (Backhed et al., 2001). Unsere Ergebnisse zeigen allerdings eine sehr starke TNF- $\alpha$ -Antwort der Makrophagen auf isoliertes UPEC-LPS trotz intaktem O-PS. Unerwarteterweise war die TNF- $\alpha$ -Konzentration hervorgerufen durch LPS des Stamms UTI89 sogar höher als die beim O26:B6-LPS, welches als Positivkontrolle benutzt wurde.

Die Immunantwort gegenüber UPEC kann durch den Grad der Acylierung des Lipid A gesenkt werden. So kann penta-acyliertes LPS, im Gegensatz zu hexa-acyliertem LPS, das bei *E. coli* in der Regel vorkommt, die proinflammatorische Zytokin-Ausschüttung unterdrücken (Backhed et al., 2003; Rallabhandi et al., 2008). Aufgrund der hohen TNF- $\alpha$  Ausschüttung durch das aufgereinigte UPEC-LPS, ist anzunehmen, dass es sich um die übliche, hexa-acylierte Form von *E. coli*-LPS handelt, die hoch immunogen wirkt.

In einer weiteren Studie wurde jedoch gezeigt, dass das isolierte LPS eines UPEC-Stammes allein, im Gegensatz zu dem lebenden Bakterienstamm, keine supprimierende Wirkung auf die Ausschüttung von IL-6 bei Blasenepithelzellen hat (Hilbert et al., 2008). Diese Feststellung entspricht auch unseren Beobachtungen im Makrophagen-Infektionsmodell, da das LPS der

UPEC sogar eine stärkere (UTI89-LPS) oder mindestens gleich starke (NU14-LPS) Zytokin-Antwort wie das O26:B6-LPS verursachte. Damit war auch bei Makrophagen keine Suppression der Zytokin-Ausschüttung durch reines UPEC-LPS ersichtlich.

Da das reine UPEC-LPS eine starke TNF- $\alpha$ -Antwort der Makrophagen zur Folge hatte, wir aber einen Einfluss der O-PS-Seitenkette des LPS auf die Immunmodulation des UPEC zweifelsfrei feststellten, etablierten wir eine sanfte LPS-Anreicherungsmethode. Durch diese nicht denaturierende Anreicherung beabsichtigten wir einen potentiellen (Protein-) Faktor, der mit LPS interagiert und für die Immunmodulation von Bedeutung ist, gemeinsam mit dem LPS anzureichern. So ist etwa bekannt, dass UPEC-Hämolysin mit LPS interagiert, um durch die Wirkung des LPS-Bindeproteins und CD14 zur Zellmembran gebracht zu werden, wo es eine Oszillation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen induziert (Mansson et al., 2007). Weiterhin wurde berichtet, dass durch die Wirkung von HlyA die Zytokin-Ausschüttung von IL-6 und TNF- $\alpha$  an Peritoneal-Makrophagen verringert wurde (Bhushan et al., 2011). Diese, durch ENDOTRAP<sup>®</sup> HD Säulen aufgereinigten, „rohen“ LPS-Proben der UTI89 und MG1655 Wildtyp-Stämme, wie auch der UTI89 $\Delta galU$ - und UTI89 $\Delta waaL$ -Mutanten-Stämme, enthielten deutliche Spuren zellulärer Proteine. Bei der Stimulation der Makrophagen erwiesen sich aber sowohl die glatte, wie auch die raue, „rohe“ LPS-Form der UPEC als gleichermaßen potent. Daher fiel die hohe TNF- $\alpha$ -Antwort gleichmäßig stark aus und entsprach der des reinen O26:B6-LPS. In diesem Versuchsansatz konnte somit kein Einfluss eines zellulären Faktors ermittelt werden, der mit dem LPS des UTI89 Wildtyp-Stamm interagiert.

Durch die Zugabe von steril filtriertem Kulturüberstand sollte zusätzlich analysiert werden, ob der UPEC-Stamm UTI89, im Gegensatz zum *E. coli* K12-Stamm MG1655 oder den UTI89-Mutanten, Wirkstoffe in ihre Umgebung abgeben, welche die Zytokin-Ausschüttung der Makrophagen dämpfen. Es ist beispielsweise bekannt, dass LPS durch *Enterobacteriaceae* in die Umgebung abgegeben wird (Mattsby-Baltzer et al., 1991). Der Grad und die Art der LPS-Abgabe und somit auch die Wirkung auf die Makrophagen könnten sich etwa durch den Verlust des O-PS ändern. Wir beobachteten allerdings, dass die Kulturüberstände des UPEC wie auch die von *E. coli* K12 und der Mutanten die Makrophagen zu einer starken TNF- $\alpha$ -Ausschüttung anregten. Die Zytokin-Antwort verursacht durch den Kulturüberstand von MG1655 war zwar geringfügig stärker als durch den des UTI89-Stammes, allerdings nicht signifikant. Auch die Deletion der Gene *galU* und *waaL* zeigte keine Auswirkung auf die Stärke der gemessenen TNF- $\alpha$ -Konzentration. Weiterhin hatte eine zusätzliche Hitzebehandlung der Kulturüberstände keinen

Einfluss auf die Zytokin-Antwort der Makrophagen. Daher ist anzunehmen, dass *E. coli* UTI89 keine immunmodulierenden Effektoren in ihre Umgebung abgeben. Außerdem konnte kein Einfluss auf die Immunmodulation von *E. coli* UTI89 im Kulturüberstand festgestellt werden, weder durch das Abscheren von LPS noch durch eine raue bzw. glatte LPS-Struktur. Vermutlich ist ein direkter Kontakt des UPEC mit den Makrophagen nötig, damit deren Immunantwort gedämpft werden kann.

Eine weitere Möglichkeit das immunogene Potential der Bakterienoberfläche zu überprüfen, ist die Analyse und Verwendung von Außenmembranvesikel (OMV). OMVs entsprechen der Bakterienoberfläche aus der sie sich abschnürten und beinhalten zusätzlich noch Bestandteile des Periplasmas (Kulp and Kuehn, 2010). Zuerst quantifizierten wir die OMV-Produktion von UTI89 und der Mutanten UTI89 $\Delta galU$  und UTI89 $\Delta waaL$ , wobei wir keinen Unterschied in der Freisetzung von OMVs feststellen konnten. Unter Berücksichtigung einer Zellzahl von etwa 150.000 KBE/ $\mu$ l, die eine 0,5 OD<sub>600nm</sub> Kultur des Stammes UTI89 bereits aufweist, erscheinen die gemessenen OMV-Werte von ca. 6.700 OMV/ $\mu$ l, als eher gering. Die Produktion von OMVs scheint daher bei UTI89 kein relevanter Faktor zu sein. Durch die niedrige OMV-Produktionsrate gestaltete es sich außerdem als schwierig, genug OMVs für die Stimulation der Makrophagen zu ernten. Die OMV-Produktion von *E. coli* könnte durch eine Mutation des *tolA*-Gens, das für ein Protein in der inneren Plasmamembran kodiert, angeregt werden, um eine ausreichende OMV-Menge zu erhalten (Bernadac et al., 1998). Allerdings wurde durch die Mutation dieses Gens auch eine fehlerhafte Präsentation und Polymerisation des O-spezifischen LPS bei *E. coli* gezeigt (Gaspar et al., 2000; Vines et al., 2005). Somit ist diese Methode zur Erhöhung der OMV-Ausbeute für diese Studie nicht praktikabel. Bei der anschließenden Stimulation der J774A.1 Makrophagen riefen sowohl die OMVs des Wildtyp-Stamms UTI89 als auch die OMVs der Mutante UTI89 $\Delta galU$  eine starke und vergleichbar hohe TNF- $\alpha$ -Ausschüttung hervor. Folglich verursachten auch die OMVs mit glattem LPS keine Reduktion der Immunantwort, was erneut demonstriert, dass das O-PS nicht der einzige relevante Faktor der Immunmodulation ist.

Da wir nur bei lebenden UPEC mit intaktem O-PS, nicht aber bei isolierten Bakterienteilen, eine Modulation der Immunantwort der Makrophagen zeigen konnten, untersuchten wir inaktivierte Bakterien. Zur Inaktivierung wurden die Bakterien entweder mit Hitze oder Formalin behandelt. Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, da Kochen die Bakterienhülle aufbricht, Formalin im Gegensatz dazu aber die äußere Hülle fixiert und weitestgehend intakt lässt. Formalin reagiert mit primären Aminen und quervernetzt diese (Thavarajah et al., 2012), daher

ist keine Veränderung der LPS-Struktur zu erwarten, da diese aus Sacchariden besteht. Formalin-fixierte Bakterien bieten das LPS somit in seiner natürlichen, unveränderten Verankerung in der Außenmembran an. In früheren Studien wurden Formalin-fixierte *E. coli* bereits verwendet, um beispielsweise die Zytokin-Ausschüttung von Epithelzellen der Harnwege zu charakterisieren (Agace et al., 1993; Hedges et al., 1992). Bei diesen Studien spielte aber die Immunmodulation der *E. coli*-Stämme keine Rolle. Unsere Messungen zeigten weder bei hitzeinaktivierten noch bei Formalin-fixierten UPEC eine Immunmodulation, unabhängig vom rauen oder glatten LPS-Typ. Die gemessene Zytokin-Ausschüttung war durchwegs stark ausgeprägt und sowohl beim Wildtyp UTI89, MG1655 und den Mutanten UTI89 $\Delta galU$  und UTI89 $\Delta waaL$  vergleichbar hoch. Das zeigt abermals, dass der alleinige Verlust des O-PS des UPEC Stammes nicht der alleinige Grund für die Immunmodulation sein kann. Ansonsten wäre bei dem Formalin-fixierten Wildtyp UPEC mit einer intakten Hülle und einer nativen Außenmembran-Verankerung des LPS eine verringerte Zytokin-Ausschüttung zu erwarten gewesen. Bereits bei Blasenepithelzellen wurde ein Verlust der Immunsuppression durch Hitzeinaktivierung der UPEC beschrieben (Hunstad et al., 2005). Unsere Studien bestätigen diese Ergebnisse auch für Makrophagen und zeigen zusätzlich, dass dies auch auf Formalin-inaktivierte UPEC mit intakter Hülle zutreffend ist. Weiterhin können wir die Hypothesen von Hilbert et al. im Rahmen ihrer Ergebnisse an Blasenepithelzellen bestätigen (Hilbert et al., 2008), Sie nahmen an, dass die Immunsuppression von UPEC wahrscheinlich ein aktiver Prozess ist, der den Metabolismus der Bakterien benötigt. Auch unsere Ergebnisse mit den inaktivierten UPEC ebenso wie mit der Mutante UTI89 $\Delta purL$  konnten zeigen, dass ein intakter Metabolismus essentiell für die Immunmodulation von UPEC ist.

### **5.6. Schlussfolgerung**

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Gene *purL* und *galU* auf den Verlust der immunmodulatorischen Fähigkeiten des UPEC-Stammes UTI89 zu ermitteln. Durch die Charakterisierung dieser Mutanten sollten weiterhin die Mechanismen aufgedeckt werden, die der UPEC-Immunmodulation zu Grunde liegen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl UTI89 $\Delta purL$  als auch UTI89 $\Delta galU$  *in vitro* zu einer signifikanten Reduktion der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung, bei einer Co-Inkubation mit J774A.1 Makrophagen, führten. Die Deletion des Purinbiosynthese-Gen *purL* führte zu einer Verhinderung des bakteriellen Wachstums und somit

des Metabolismus unter Purin-limitierenden Umständen, wie sie beim *in vitro* Infektionsversuch gegeben sind. Diese Ergebnisse wurden durch eine weitere Purinbiosynthese-Mutante, UTI89 $\Delta$ *purM* und Supplementationsversuche mit IMP bestätigt. Diese demonstrieren, dass trotz deutlichem Bakterienüberschuss (MOI 50) ein intakter Metabolismus unerlässlich ist, um die Immunantwort der Makrophagen zu manipulieren. Die Analyse der *galU* Deletions-Mutante zeigte, dass sie eine raue LPS-Struktur besitzt. Durch weitere Versuche mit den Mutanten UTI89 $\Delta$ *waaL* und UTI89 $\Delta$ *waaG*, ebenfalls mit rauem LPS, konnten wir zeigen, dass der Verlust des O-PS ursächlich am Verlust der Immunmodulation des UPEC-Stammes beteiligt ist. Diese Ergebnisse bestätigen auch die Studien anderer Arbeitsgruppen über die Immunmodulation von UPEC an Blasenepithelzellen (Billips et al., 2008; Hunstad et al., 2005), was eine Allgemeingültigkeit unserer Aussagen unterstreicht. Versuche mit reinem ebenso wie „rohem“ LPS, Zellkulturüberstand, Außenmembranvesikeln und vor allem durch Formalin-fixierte Bakterien ergaben allerdings, dass das O-PS von UTI89, wenn auch ein essentieller, dennoch nicht der alleinige Faktor für die Reduktion der Immunantwort sein kann. Dieses Ergebnis wird auch durch Beobachtungen über die IL-6-Ausschüttung von UPEC-LPS stimulierten Blasenepithelzellen unterstützt (Hilbert et al., 2008). Der finale Mechanismus bleibt allerdings noch unklar und muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammengefasst konnten wir herausarbeiten, dass es sich bei der Immunsuppression durch UPEC um einen aktiven Prozess handelt, der einen intakten Metabolismus benötigt und für den das O-PS zwar ein eminent bedeutender, nicht aber der einzig relevante Faktor ist. Diese Ergebnisse gestatten weitere Einblicke in die Interaktion zwischen UPEC und dem Wirt und mögen daher für zukünftige Untersuchungen hilfreich sein.

### **5.7. Ausblick**

Wenn auch die Ergebnisse dieser Studie interessante Einblicke in die Funktionsweise der Immunmodulation durch UPEC gewähren, liegt ein konkreter Mechanismus noch im Unklaren. Die Beteiligung weiterer Proteinfaktoren ist anzunehmen, da nur lebende UPEC mit einem funktionierenden Metabolismus die Immunantwort des Wirts dämpfen. Weiterhin sollte in zukünftigen Projekten nach Faktoren gesucht werden, die entweder mit dem O-PS des LPS interagieren oder die ein intaktes LPS für ihre Sekretion benötigen. Obwohl unsere Versuche mit

„rohem“ LPS oder auch OMVs auf die Zytokin-Ausschüttung keinen Einfluss eines Proteinfaktors aufgezeigt haben, kann eine Beteiligung nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Schließlich bieten sich zukünftige Studien in Versuchstieren an, um zu überprüfen, ob der Verlust der Immunmodulation *in vitro* zu einer Reduktion der Virulenz sowie zu einer niedrigeren Kolonisationsrate der Harnwege, *in vivo* führt. Auf lange Sicht wäre es wünschenswert, dass durch diese Ergebnisse und kommende Studien, neue Zielstrukturen ermittelt werden, die zur Entwicklung verbesserter Therapiemöglichkeiten oder einem neuen Vakzin führen.

### **6. Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Charakterisierung genetischer Faktoren uropathogener *Escherichia coli* (UPEC), welche an deren Modulation der Wirts-Immunantwort beteiligt sind. UPEC sind die häufigsten Erreger ambulant erworbener Harnwegsinfektion (ca. 80%) und mit einer Vielzahl verschiedener Pathogenitätsfaktoren ausgestattet, die eine Besiedelung des Harntrakts ermöglichen. Einige bereits bekannte Pathogenitätsfaktoren, wie etwa das „TIR-Domänen-beinhaltende-Protein *coli*“ (TcpC) befähigen UPEC die Immunantwort des Wirts zu verringern. Allerdings liegen viele weitere Mechanismen der bakteriellen Immunsuppression durch UPEC noch im Unklaren.

Diese Arbeit greift auf Daten einer Transposon-Mutagenese zurück, die eine Beteiligung des Purinbiosynthese-Gens *purL* und des Glucosemetabolismus-Gens *galU* an der Immunmodulation vermuten ließen. Zuerst zeigten wir, dass der UPEC-Stamm UTI89 die Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  durch J774A.1 Makrophagen im Vergleich zum *E. coli* K-12 Stamm MG1655 signifikant reduziert. Im Anschluss wurden dann gezielte Deletionsmutanten der beiden Gene im Stamm UTI89 erstellt. Bei beiden Mutanten konnte eine signifikant höhere Ausschüttung von TNF- $\alpha$  bei einer Co-Inkubation mit den Makrophagen gemessen werden. In beiden Fällen konnte die Gendeletion plasmidal komplementiert werden. Anschließend wurden beide Mutanten phänotypisch charakterisiert, um die Mechanismen der Immunsuppression offen zu legen.

Um einen Einfluss der *de novo* Purinbiosynthese auf die Immunsuppressions-Fähigkeit zu validieren, wurde eine weitere Purinbiosynthese-Mutante durch Deletion des *purM*-Gens generiert. Diese Mutante zeigte ebenfalls einen Verlust der Immunsuppression bei Co-Inkubation mit Makrophagen. Die Analyse der Biofilm- und Kapselbildung, der Struktur des Lipopolysaccharids (LPS) und der Zytotoxizität konnte keine Unterschiede zum Wildtyp aufzeigen. Die weitere Charakterisierung durch phänotypische Microarrays zeigte allerdings mehrere, durch die *purL*-Deletion verursachte Defizite im Kohlenstoffmetabolismus. Weiterhin war auffällig, dass die Purinbiosynthese-Mutanten ihr Wachstum im Infektionsexperiment, im Gegensatz zum Wachstum in Vollmedium, einstellten. Durch Zugabe einer Purin-Vorstufe konnte sowohl das Wachstum, als auch die Fähigkeit zur Immunsuppression wieder hergestellt



werden. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Bakterien nur bei funktionsfähiger Purinbiosynthese befähigt sind die Zytokin-Ausschüttung der Makrophagen zu senken, trotz genereller Lebensfähigkeit und großem Überschuss.

Die phänotypische Charakterisierung der *galU*-Deletionsmutante zeigte bei der Biofilm- und Kapselbildung, ebenso wie bei der Zytotoxizität und den Wachstumsraten im Experiment keine Unterschiede zum Wildtyp. Allerdings waren Defizite bei der Nutzung bestimmter Kohlenstoffquellen und beim intrazellulären Vorkommen in Makrophagen erkennbar. Des Weiteren war ein Verlust des O-Polysaccharids (O-PS) als Teil des Lipopolysaccharids des mutierten Stamms augenscheinlich. Um einen konkreten Zusammenhang zwischen dem Verlust des O-PS und dem Verlust der Immunsuppression aufzuzeigen, wurden weitere LPS-Strukturmutanten durch die Deletion der Gene *waaL*, *waaG* und *cld* erzeugt. Die Überprüfung dieser Mutanten bestätigte, dass ein Totalverlust des O-PS nicht aber eine Veränderung der O-PS-Längenverteilung die Immunsuppression verhindert. Obwohl somit die Immunsuppression mit dem O-PS von UTI89 verknüpft ist, konnte durch isoliertes LPS des Wildtyp-Stamms UTI89 keine Verminderung der Zytokin-Ausschüttung festgestellt werden. Auch bei Wildtyp-Bakterien, die mit Hitze oder Formalin inaktiviert wurden, ebenso wie durch sterilen Kulturüberstand konnte, trotz unverändertem O-PS, keine Beeinflussung der ausgeschütteten TNF- $\alpha$  Menge gemessen werden. Dieselbe Beobachtung traf auch auf Außenmembranvesikel mit oder ohne O-PS zu, wenn Makrophagen damit stimuliert wurden.

Es konnte somit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion des *galU*-Gens einen Verlust des O-PS verursacht, der in einer erhöhten Zytokin-Antwort *in vitro* resultiert. Interessanterweise ist die Veränderung der LPS Struktur aber nicht der alleinige Grund für den Verlust der Immunsuppression, sondern wahrscheinlich ist das LPS nur Teil eines Mechanismus, der noch weiterer Klärung bedarf. Diese neuen Erkenntnisse könnten zukünftig helfen, die komplexen Interaktionen zwischen UPEC und Immunzellen besser zu verstehen.

### **7. Summary**

The major topic of this study was the characterization of genetic factors that enable *uropathogenic Escherichia coli* (UPEC) to modulate the host immune response. UPEC are the most common agent of community acquired urinary tract infections (~ 80%). They possess a broad variety of pathogenicity factors, which enable bacteria to colonize the urinary tract. Some of those factors, like the TIR domain-containing protein *coli* (TcpC) suppress the host immune response. But still further immune modulating mechanisms need to be investigated.

This work is based on the results of a transposon mutagenesis, which revealed a possible influence of the purine biosynthesis gene *purL* and the glucose metabolism gene *galU* on the immune modulation by UPEC. First, we demonstrated a significant reduction of the release of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  by J774A.1 macrophages caused by UPEC strain UTI89. Subsequently, we created site-directed deletions of the *purL* and *galU* genes in this strain. Both deletion mutants showed a significant increase in the cytokine response when co-incubated with macrophages. Further, we were able to restore the wild-type phenotype by a plasmidal complementation in both cases. In the next step, both mutants were phenotypically characterized to gain insight in the underlying mechanism of immune suppression.

In order to confirm an influence of the purine biosynthesis on immune modulation, a further knockout mutant was created by deleting the *purM* gene. This mutant also caused an increased TNF- $\alpha$  response, when co-incubated with macrophages, which points out the impact of the purine synthesis on the immune suppression. Further characterization of the capsule and biofilm formation, as well as the structure of the lipopolysaccharide (LPS) and the cytotoxicity could not reveal any difference between the *purL* deletion mutant and the wild type UPEC. In contrast, the analysis of the carbon metabolism using phenotypical microarrays showed several deficits in the metabolism of distinct substrates. Moreover, we noticed significant growth deficits of the *purL* mutant grown in the medium of the macrophage infection assay, despite normal growth in rich medium. Growth and the immune-suppressive capacity of the wild-type could be restored by addition of a purine synthesis precursor. Those results clearly demonstrate that only UPEC with an intact purine metabolism could dampen the cytokine release of the macrophages, even though the mutants were applied in a vital manner and in a large excess.

## 7. Summary

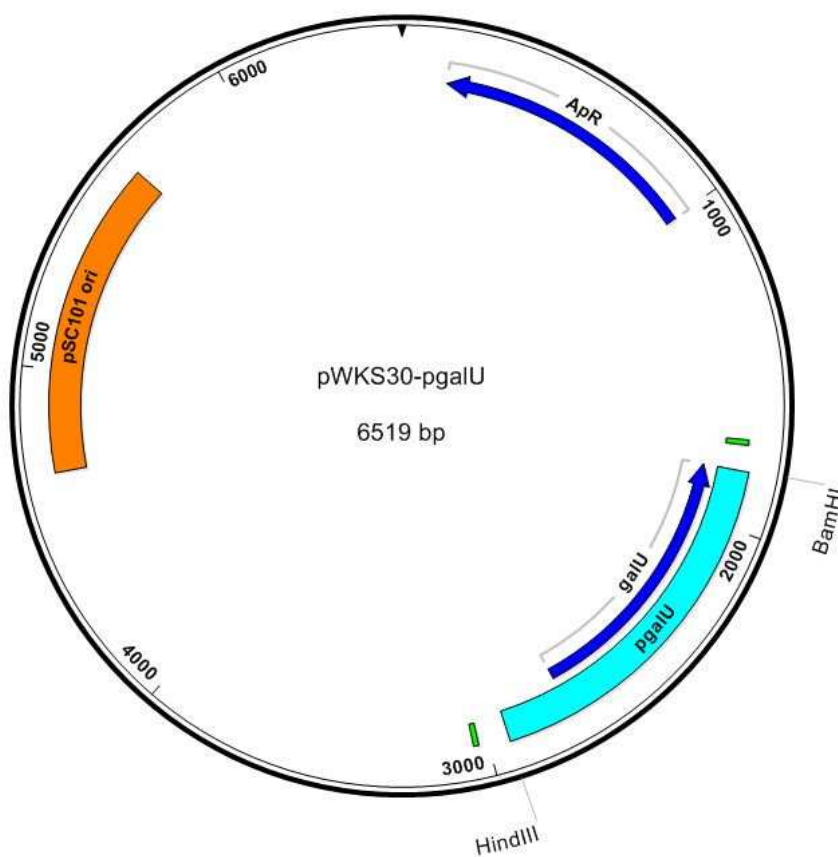
---

The characterization of the *galU* deletion mutants also revealed no differences to the wild-type regarding formation of biofilms and capsule, as well as cytotoxicity and growth. However, we observed deficits in the use of distinct carbon sources and a reduced intracellular presence of the *galU* deletion mutant. More strikingly, the LPS of the mutants lacked the O-polysaccharide (O-PS). To confirm a link between the loss of the O-PS and the loss of the immune suppression, we created further LPS-structure mutants by deleting the *waaL*, *waaG* and *cld* genes in UPEC strain UTI89. Investigating these strains approved that a loss of the O-PS, but not a shift in the O-PS length pattern results in the increased TNF- $\alpha$  response. Although we demonstrated a link between the UPEC O-PS and immune suppression, isolated LPS from UPEC strain UTI89 caused a high cytokine response of the macrophages. We observed the same when we tested heat or formalin inactivated bacteria and sterile culture supernatant. Also outer membrane vesicles caused a high immune response, regardless if they were derived from the wild-type UPEC UTI89 or from the O-PS-deficient mutant. In summary, we were able to show that deletion of the *galU* gene in UPEC strain UTI89 causes a loss of the O-PS, which results in an increased cytokine response *in vitro*. Interestingly, the loss of the O-PS is not the only cause for the lost immune suppression, but more likely part of a more complex mechanism, which needs to be further clarified. Nevertheless, these new results will help to gain more understanding of the interactions between UPEC and cells of the host immune system.

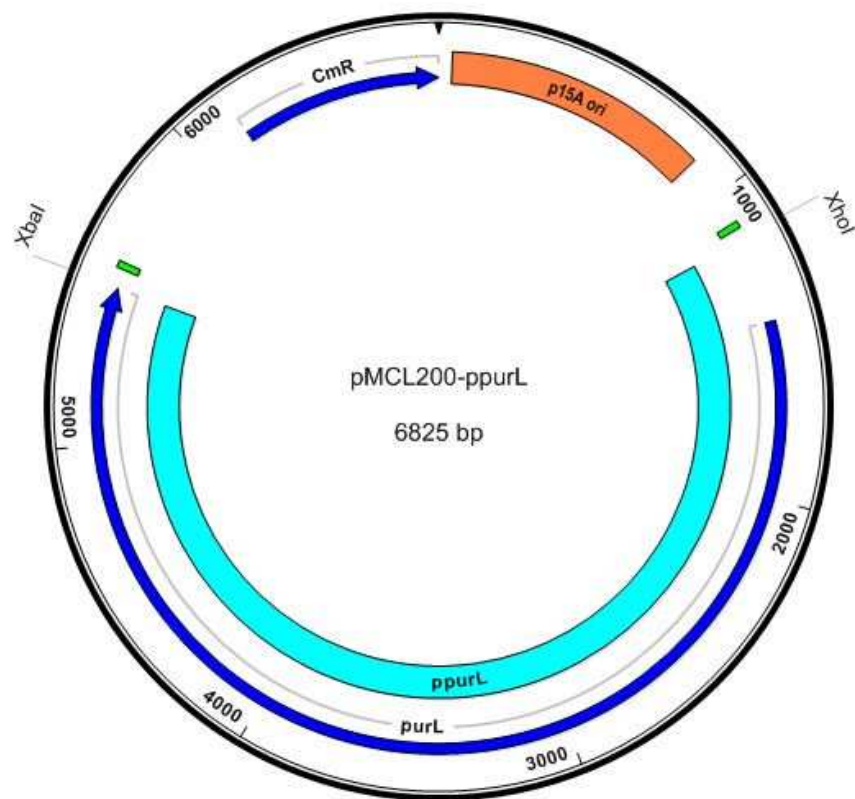
## **8. Anhang**

### **8.1. Plasmidkarten**

Im Folgenden sind Plasmid Karten der verwendeten Plasmide pWKS30-*pgalU* und pMCL200-*ppurL* aufgeführt.



pWKS30-*pgalU*: pSC101 ori (orange); Bindestellen Sequenzierungsprimer (grün), *pgalU*-Gen (türkis); *galU* und Ap<sup>R</sup> ORF (blau)



pMCL200-*ppurL*: p15A ori (orange); Bindestellen Sequenzierungsprimer (grün), *ppurL*-Gen (türkis); *purL* und Cm<sup>R</sup> ORF (blau)

## **8.2. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Schematische Übersicht relevanter UPEC-Pathogenitätsfaktoren
Abb. 2	Schematischer Aufbau der Zuckerstruktur des <i>E. coli</i> R1-LPS-Typs
Abb. 3	Schematische Darstellung der LPS Erkennung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch MyD88
Abb. 4	DNA und Protein Längenstandard
Abb. 5	TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen bei Co-Inkubation mit <i>E. coli</i> Stämmen
Abb. 6	TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bei verschiedenen Multiplizitäten der Infektion
Abb. 7	Verlauf der Zytokin-Ausschüttung bei Vorstimulation mit LPS
Abb. 8	Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta purL$
Abb. 9	Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta galU$
Abb. 10	Biofilmbildung von UTI89 $\Delta purL$
Abb. 11	Kapselfärbung von UTI89 $\Delta purL$
Abb. 12	Latex-Agglutinationstest mit UTI89 $\Delta purL$
Abb. 13	Silberfärbung des UTI89 $\Delta purL$ LPS
Abb. 14	J774A.1 Überlebensrate bei Co-Inkubation mit UTI89 $\Delta purL$
Abb. 15	Durch PurL und PurM katalysierte Purinbiosyntheseschritte
Abb. 16	Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta purM$
Abb. 17	Bestimmung der Bakterienzahl von UTI89 $\Delta purL$ im Infektionsmodell
Abb. 18	Wachstumskurven in RPMI 1640 + 10% FBS
Abb. 19	Wachstumskurve von UTI89 $\Delta purL$ bei IMP-Supplementierung
Abb. 20	Makrophagen Infektion mit UTI89 $\Delta purL$ bei IMP-Supplementation
Abb. 21	J774A.1 Überlebensrate bei Infektion mit UTI89 $\Delta galU$
Abb. 22	Bakterienzahl von UTI89 $\Delta galU$ im Infektionsmodell
Abb. 23	Kapselfärbung von UTI89 $\Delta galU$
Abb. 24	Latex-Agglutinationstest mit UTI89 $\Delta galU$
Abb. 25	Silberfärbung des UTI89 $\Delta galU$ LPS
Abb. 26	Silberfärbung des LPS verschiedener O-PS Mutanten
Abb. 27	Zytokin-Antwort auf Co-Inkubation mit UTI89 $\Delta waaL$ und UTI89 $\Delta waaG$

Abb. 28	Silberfärbung des LPS von UTI89 <i>cld::cm</i>
Abb. 29	Makrophagen Infektion mit UTI89 <i>cld::cm</i>
Abb. 30	Biofilmbildung von UTI89 $\Delta$ <i>waaL</i> und UTI89 $\Delta$ <i>galU</i>
Abb. 31	Intrazelluläres Vorkommen von UTI89 $\Delta$ <i>waaL</i> und UTI89 $\Delta$ <i>galU</i>
Abb. 32	Stimulation der Makrophagen mit reinem LPS
Abb. 33	Silberfärbung des LPS verschiedener Aufreinigungsmethoden
Abb. 34	TNF- $\alpha$ -Ausschüttung bei Makrophagen-Stimulation mit „rohem“ LPS
Abb. 35	Makrophagen-Stimulation mit sterilem Kulturüberstand
Abb. 36	Stimulation der Makrophagen mit Außenmembranvesikel
Abb. 37	Co-Inkubation der Makrophagen mit hitzeinaktivierten Bakterien
Abb. 38	Co-Inkubation von Makrophagen und Formalin fixierten Bakterien

### **8.3. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Bakterielle Stämme
Tab. 2	Verwendete Antibiotika
Tab. 3	Verwendete Plasmide
Tab. 4	Oligonukleotide für PCR
Tab. 5	Technische Ausstattung
Tab. 6	Biolog <sup>TM</sup> Analysen von UTI89 $\Delta$ <i>purL</i>
Tab. 7	Biolog <sup>TM</sup> Analysen von UTI89 $\Delta$ <i>galU</i>
Tab. 8	OMV Konzentrationen

## **9. Literaturverzeichnis**

Teile dieser Arbeit wurden zur Publikation akzeptiert und befinden sich derzeit im Druck:

**Meyer, C.**, Hoffmann, C., Haas, R., Schubert, S. 2015 The role of the *galU* gene of uropathogenic *Escherichia coli* in modulating macrophage TNF- $\alpha$  response. Int. J. Med. Microbiol.

### Verwendete Literatur:

Agace, W., Hedges, S., Andersson, U., Andersson, J., Ceska, M., Svanborg, C., 1993. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. Infect. Immun. 61, 602-609.

Alcantara, R.B., Read, R.D., Valderas, M.W., Brown, T.D., Roop, R.M., 2004. Intact purine biosynthesis pathways are required for wild-type virulence of *Brucella abortus* 2308 in the BALB/c mouse model. Infect. Immun. 72, 4911-4917.

Anders, H.J., Patole, P.S., 2005. Toll-like receptors recognize uropathogenic *Escherichia coli* and trigger inflammation in the urinary tract. Nephrol. Dial. Transplant. 20, 1529-1532.

Andersen-Nissen, E., Hawn, T.R., Smith, K.D., Nachman, A., Lampano, A.E., Uematsu, S., Akira, S., Aderem, A., 2007. Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. J. Immunol. 178, 4717-4720.

Anderson, G.G., Goller, C.C., Justice, S., Hultgren, S.J., Seed, P.C., 2010. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. Infect. Immun. 78, 963-975.

Anderson, G.G., Palermo, J.J., Schilling, J.D., Roth, R., Heuser, J., Hultgren, S.J., 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. Science 301, 105-107.

Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodriguez-Quinones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol. Rev. 27, 215-237.

Backhed, F., Meijer, L., Normark, S., Richter-Dahlfors, A., 2002. TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. Cell Microbiol. 4, 493-501.

Backhed, F., Normark, S., Schweda, E.K., Oscarson, S., Richter-Dahlfors, A., 2003. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. Microbes. Infect. 5, 1057-1063.



- Backhed, F., Soderhall, M., Ekman, P., Normark, S., Richter-Dahlfors, A., 2001. Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cell Microbiol.* 3, 153-158.
- Bahrani-Mougeot, F.K., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Hebel, J.R., Johnson, D.E., Tang, C.M., Donnenberg, M.S., 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* 45, 1079-1093.
- Balsalobre, C., Silvan, J.M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E., Wai, S.N., 2006. Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 59, 99-112.
- Barasch, J., Mori, K., 2004. Cell biology: iron thievery. *Nature* 432, 811-813.
- Bates, J.M., Raffi, H.M., Prasad, K., Mascarenhas, R., Laszik, Z., Maeda, N., Hultgren, S.J., Kumar, S., 2004. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int.* 65, 791-797.
- Batler, R.A., Sengupta, S., Forrestal, S.G., Schaeffer, A.J., Klumpp, D.J., 2002. Mast cell activation triggers a urothelial inflammatory response mediated by tumor necrosis factor-alpha. *J. Urol.* 168, 819-825.
- Bentley, R., Meganathan, R., 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiol. Rev.* 46, 241-280.
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S., Lloubes, R., 1998. *Escherichia coli* *tol-pal* mutants form outer membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 180, 4872-4878.
- Berry, R.E., Klumpp, D.J., Schaeffer, A.J., 2009. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 77, 2762-2772.
- Bhushan, S., Hossain, H., Lu, Y., Geisler, A., Tchatalbachev, S., Mikulski, Z., Schuler, G., Klug, J., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Chakraborty, T., Meinhardt, A., 2011. Uropathogenic *E. coli* induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: implications for testicular immune privilege. *PLoS. One.* 6, e28452.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., Karch, H., 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 671-676.
- Bien, J., Sokolova, O., Bozko, P., 2012. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int. J. Nephrol.* 2012, 681473.

- Billips, B.K., Forrestal, S.G., Rycyk, M.T., Johnson, J.R., Klumpp, D.J., Schaeffer, A.J., 2007. Modulation of host innate immune response in the bladder by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 75, 5353-5360.
- Billips, B.K., Schaeffer, A.J., Klumpp, D.J., 2008. Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder. *Infect. Immun.* 76, 3891-3900.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., III, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462.
- Boels, I.C., Ramos, A., Kleerebezem, M., de Vos, W.M., 2001. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3033-3040.
- Bolton, F.J., Aird, H., 1998. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: public health and microbiological significance. *Br. J. Biomed. Sci.* 55, 127-135.
- Bonanno, L., Loukiadis, E., Mariani-Kurkdjian, P., Oswald, E., Garnier, L., Michel, V., Auvray, F., 2015. Diversity of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) O26:H11 Strains Examined via stx Subtypes and Insertion Sites of Stx and EspK Bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3712-3721.
- Bonofiglio, L., Garcia, E., Mollerach, M., 2005. Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis. *Curr. Microbiol.* 51, 217-221.
- Bower, J.M., Eto, D.S., Mulvey, M.A., 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic.* 6, 18-31.
- Breakwell, D.P., Moyes, R.B., Reynolds, J., 2009. Differential staining of bacteria: capsule stain. *Curr. Protoc. Microbiol.* Appendix 3, Appendix.
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M., 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417-427.
- Caron, F., Alexandre, K., Pestel-Caron, M., Chassagne, P., Grise, P., Etienne, M., 2015. High bacterial titers in urine are predictive of abnormal postvoid residual urine in patients with urinary tract infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 63-67.
- Chang, H.Y., Lee, J.H., Deng, W.L., Fu, T.F., Peng, H.L., 1996. Virulence and outer membrane properties of a galU mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microb. Pathog.* 20, 255-261.
- Chassin, C., Vimont, S., Cluzeaud, F., Bens, M., Goujon, J.M., Fernandez, B., Hertig, A., Rondeau, E., Arlet, G., Hornef, M.W., Vandewalle, A., 2008. TLR4 facilitates translocation of bacteria across renal collecting duct cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 2364-2374.

- Chen, S.L., Hung, C.S., Xu, J., Reigstad, C.S., Magrini, V., Sabo, A., Blasiar, D., Bieri, T., Meyer, R.R., Ozersky, P., Armstrong, J.R., Fulton, R.S., Latreille, J.P., Spieth, J., Hooton, T.M., Mardis, E.R., Hultgren, S.J., Gordon, J.I., 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 5977-5982.
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C., Miethke, T., 2008. Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat. Med.* 14, 399-406.
- Cleary, J., Lai, L.C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., Knutton, S., 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150, 527-538.
- Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S., Svanborg, C., 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9827-9832.
- Contamin, S., Galmiche, A., Doye, A., Flatau, G., Benmerah, A., Boquet, P., 2000. The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol. Biol. Cell* 11, 1775-1787.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6640-6645.
- Davis, C.E., Brown, K.R., Douglas, H., Tate, W.J., III, Braude, A.I., 1969. Prevention of death from endotoxin with antisera. I. The risk of fatal anaphylaxis to endotoxin. *J. Immunol.* 102, 563-572.
- Davis, J.M., Carvalho, H.M., Rasmussen, S.B., O'Brien, A.D., 2006. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infect. Immun.* 74, 4401-4408.
- Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Motamedifar, M., Arabshahi, S., Novinrooz, A., Borojeni, A.M., Bahadori, M., Heidari, S., 2015. Virulence characteristics and antibiotic resistance patterns among different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Jpn. J. Infect. Dis.*
- Dhakal, B.K., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Invest* 38 Suppl 2, 2-11.
- Dhakal, B.K., Mulvey, M.A., 2012. The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host. Microbe* 11, 58-69.

- Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L.A., 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2950-2958.
- Dobrindt, U., Chowdary, M.G., Krumbholz, G., Hacker, J., 2010. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.* 199, 145-154.
- Engel, D., Dobrindt, U., Tittel, A., Peters, P., Maurer, J., Gutgemann, I., Kaissling, B., Kuziel, W., Jung, S., Kurts, C., 2006. Tumor necrosis factor alpha- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells are rapidly recruited to the bladder in urinary tract infection but are dispensable for bacterial clearance. *Infect. Immun.* 74, 6100-6107.
- Engel, D.R., Maurer, J., Tittel, A.P., Weisheit, C., Cavlar, T., Schumak, B., Limmer, A., van, R.N., Trautwein, C., Tacke, F., Kurts, C., 2008. CCR2 mediates homeostatic and inflammatory release of Gr1(high) monocytes from the bone marrow, but is dispensable for bladder infiltration in bacterial urinary tract infection. *J. Immunol.* 181, 5579-5586.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I.R., 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes. Infect.* 4, 837-851.
- Escherich, T., 1885. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Rev. Infect. Dis.* 11, 352-356.
- Eto, D.S., Jones, T.A., Sundsbak, J.L., Mulvey, M.A., 2007. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS. Pathog.* 3, e100.
- Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E.M., Laternus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H.C., Wieler, L.H., 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 163-176.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., Aderem, A., 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917-921.
- Foxman, B., 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis. Mon.* 49, 53-70.
- Gaspar, J.A., Thomas, J.A., Marolda, C.L., Valvano, M.A., 2000. Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein. *Mol. Microbiol.* 38, 262-275.
- Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M.S., Oudega, B., 1999. Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch. Microbiol.* 172, 1-8.

- Gur, C., Copenhagen-Glazer, S., Rosenberg, S., Yamin, R., Enk, J., Glasner, A., Bar-On, Y., Fleissig, O., Naor, R., Abed, J., Mevorach, D., Granot, Z., Bachrach, G., Mandelboim, O., 2013. Natural killer cell-mediated host defense against uropathogenic *E. coli* is counteracted by bacterial hemolysinA-dependent killing of NK cells. *Cell Host. Microbe* 14, 664-674.
- Hagan, E.C., Mobley, H.L., 2009. Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Mol. Microbiol.* 71, 79-91.
- Hancock, V., Ferrieres, L., Klemm, P., 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology* 154, 167-175.
- Hannan, T.J., Totsika, M., Mansfield, K.J., Moore, K.H., Schembri, M.A., Hultgren, S.J., 2012. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 616-648.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., Winkelmann, G., 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3677-3682.
- Haraoka, M., Hang, L., Frendeus, B., Godaly, G., Burdick, M., Strieter, R., Svanborg, C., 1999. Neutrophil recruitment and resistance to urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* 180, 1220-1229.
- He, B., Shiau, A., Choi, K.Y., Zalkin, H., Smith, J.M., 1990. Genes of the *Escherichia coli* pur regulon are negatively controlled by a repressor-operator interaction. *J. Bacteriol.* 172, 4555-4562.
- Hedges, S., Svensson, M., Svanborg, C., 1992. Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation *in vitro*. *Infect. Immun.* 60, 1295-1301.
- Hehlhans, T., Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
- Heinrichs, D.E., Yethon, J.A., Whitfield, C., 1998. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 30, 221-232.
- Hilbert, D.W., Pascal, K.E., Libby, E.K., Mordechai, E., Adelson, M.E., Trama, J.P., 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* dominantly suppress the innate immune response of bladder epithelial cells by a lipopolysaccharide- and Toll-like receptor 4-independent pathway. *Microbes. Infect.* 10, 114-121.

- Hirose, T., Kumamoto, Y., Matsukawa, M., Yokoo, A., Satoh, T., Matsuura, A., 1992. [Study on local immune response in *Escherichia coli*-induced experimental urinary tract infection in mice--infiltration of Ia-positive cells, macrophages, neutrophils, T cells and B cells]. *Kansenshogaku Zasshi* 66, 964-973.
- Hitchcock, P.J., Brown, T.M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154, 269-277.
- Hoffman, H., Valdina, J., Frank, M.E., 1966. Effects of high incubation temperature upon the cell wall of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91, 1635-1637.
- Hudault, S., Guignot, J., Servin, A.L., 2001. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 49, 47-55.
- Hunstad, D.A., Justice, S.S., Hung, C.S., Lauer, S.R., Hultgren, S.J., 2005. Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 73, 3999-4006.
- Hvidberg, H., Struve, C., Krogfelt, K.A., Christensen, N., Rasmussen, S.N., Frimodt-Moller, N., 2000. Development of a long-term ascending urinary tract infection mouse model for antibiotic treatment studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 156-163.
- Ingersoll, M.A., Kline, K.A., Nielsen, H.V., Hultgren, S.J., 2008. G-CSF induction early in uropathogenic *Escherichia coli* infection of the urinary tract modulates host immunity. *Cell Microbiol.* 10, 2568-2578.
- Jacobi, C.A., Malfertheiner, P., 2011. *Escherichia coli* Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium. *Dig. Dis.* 29, 600-607.
- Jayakar, H.R., Parvathareddy, J., Fitzpatrick, E.A., Bina, X.R., Bina, J.E., Re, F., Emery, F.D., Miller, M.A., 2011. A galU mutant of *Francisella tularensis* is attenuated for virulence in a murine pulmonary model of tularemia. *BMC. Microbiol.* 11, 179.
- Johnson, J.R., 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 80-128.
- Johnson, J.R., Delavari, P., O'Bryan, T.T., 2001. *Escherichia coli* O18:K1:H7 isolates from patients with acute cystitis and neonatal meningitis exhibit common phylogenetic origins and virulence factor profiles. *J. Infect. Dis.* 183, 425-434.
- Johnson, J.R., Russo, T.A., 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab Clin. Med.* 139, 155-162.
- Kadzhaev, K., Zingmark, C., Golovliov, I., Bolanowski, M., Shen, H., Conlan, W., Sjostedt, A., 2009. Identification of genes contributing to the virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a mouse intradermal infection model. *PLoS. One.* 4, e5463.

- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2, 123-140.
- Kauffmann, F., 1946. Studies on the serology of the *Escherichia coli* group. J. Bacteriol. 51, 126.
- Kern, M.B., Struve, C., Blom, J., Frimodt-Møller, N., Krogh, K.A., 2005. Intracellular persistence of *Escherichia coli* in urinary bladders from mecillinam-treated mice. J. Antimicrob. Chemother. 55, 383-386.
- Khan, S.A., Everest, P., Servos, S., Foxwell, N., Zahring, U., Brade, H., Rietschel, E.T., Dougan, G., Charles, I.G., Maskell, D.J., 1998. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. Mol. Microbiol. 29, 571-579.
- Kim, K.S., 2002. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. J. Infect. Dis. 186 Suppl 2, S220-S224.
- Kim, K.S., Itabashi, H., Gemski, P., Sadoff, J., Warren, R.L., Cross, A.S., 1992. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. J. Clin. Invest. 90, 897-905.
- King, J.E., Aal Owaif, H.A., Jia, J., Roberts, I.S., 2015. Phenotypic Heterogeneity in Expression of the K1 Polysaccharide Capsule of Uropathogenic *Escherichia coli* and its Down Regulation during Growth in Urine. Infect. Immun.
- Komaniecka, I., Choma, A., Lindner, B., Holst, O., 2010. The structure of a novel neutral lipid A from the lipopolysaccharide of *Bradyrhizobium elkanii* containing three mannose units in the backbone. Chemistry. 16, 2922-2929.
- Korhonen, T.K., Virkola, R., Holthofer, H., 1986. Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P fimbriae in the human kidney. Infect. Immun. 54, 328-332.
- Krogh, K.A., Poulsen, L.K., Molin, S., 1993. Identification of coccoid *Escherichia coli* BJ4 cells in the large intestine of streptomycin-treated mice. Infect. Immun. 61, 5029-5034.
- Kulesus, R.R., Diaz-Perez, K., Slechta, E.S., Eto, D.S., Mulvey, M.A., 2008. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 76, 3019-3026.
- Kulp, A., Kuehn, M.J., 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. Annu. Rev. Microbiol. 64, 163-184.
- Landraud, L., Gauthier, M., Fosse, T., Boquet, P., 2000. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. Lett. Appl. Microbiol. 30, 213-216.
- Lane, M.C., Mobley, H.L., 2007. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. Kidney Int. 72, 19-25.

- Lemonnier, M., Landraud, L., Lemichez, E., 2007. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 515-534.
- Lesse, A.J., Campagnari, A.A., Bittner, W.E., Apicella, M.A., 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods* 126, 109-117.
- Li, Z., Clarke, A.J., Beveridge, T.J., 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J. Bacteriol.* 180, 5478-5483.
- Maeshima, N., Fernandez, R.C., 2013. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect. Microbiol.* 3, 3.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., Abraham, S.N., 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381, 77-80.
- Mansson, L.E., Kjall, P., Pellett, S., Nagy, G., Welch, R.A., Backhed, F., Frisan, T., Richter-Dahlfors, A., 2007. Role of the lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 75, 997-1004.
- Marrs, C.F., Zhang, L., Tallman, P., Manning, S.D., Somsel, P., Raz, P., Colodner, R., Jantunen, M.E., Siitonen, A., Saxen, H., Foxman, B., 2002. Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 51, 138-142.
- Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J., 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 19, 2803-2812.
- Mattsby-Baltzer, I., Lindgren, K., Lindholm, B., Edebo, L., 1991. Endotoxin shedding by enterobacteria: free and cell-bound endotoxin differ in *Limulus* activity. *Infect. Immun.* 59, 689-695.
- Mendes, S.D., Domingues, L., 2015. On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf* 113, 400-411.
- Muller-Loennies, S., Brade, L., Brade, H., 2007. Neutralizing and cross-reactive antibodies against enterobacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 321-340.
- Mulvey, M.A., 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 4, 257-271.
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J., Hultgren, S.J., 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282, 1494-1497.
- Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Hultgren, S.J., 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect. Immun.* 69, 4572-4579.



- Nagamatsu, K., Hannan, T.J., Guest, R.L., Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Binkley, J., Dodson, K., Raivio, T.L., Hultgren, S.J., 2015. Dysregulation of *Escherichia coli* alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 112, E871-E880.
- Nakano, Y., Yoshida, Y., Yamashita, Y., Koga, T., 1995. Construction of a series of pACYC-derived plasmid vectors. *Gene* 162, 157-158.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
- Nesper, J., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Kapfhammer, D., Kraiss, A., Reidl, J., 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 69, 435-445.
- Nowicki, B., Selvarangan, R., Nowicki, S., 2001. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J. Infect. Dis.* 183 Suppl 1, S24-S27.
- Ochman, H., Bergthorsson, U., 1998. Rates and patterns of chromosome evolution in enteric bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 580-583.
- Ostolaza, H., Goni, F.M., 1995. Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity. *FEBS Lett.* 371, 303-306.
- Pak, J., Pu, Y., Zhang, Z.T., Hasty, D.L., Wu, X.R., 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 9924-9930.
- Pearsall, N.N., Sherris, J.C., 1966. The demonstration of specific urinary anti-bodies in urinary tract infections caused by Gram-negative bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.* 91, 589-595.
- Pichon, C., Hechard, C., du, M.L., Chaudray, C., Bonne, I., Guadagnini, S., Vandewalle, A., Le, B.C., 2009. Uropathogenic *Escherichia coli* AL511 requires flagellum to enter renal collecting duct cells. *Cell Microbiol.* 11, 616-628.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van, H.C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B., 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Raetz, C.R., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700.

- Rallabhandi, P., Awomoyi, A., Thomas, K.E., Phalipon, A., Fujimoto, Y., Fukase, K., Kusumoto, S., Qureshi, N., Szein, M.B., Vogel, S.N., 2008. Differential activation of human TLR4 by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. *J. Immunol.* 180, 1139-1147.
- Ralph, P., Moore, M.A., Nilsson, K., 1976. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J. Exp. Med.* 143, 1528-1533.
- Reigstad, C.S., Hultgren, S.J., Gordon, J.I., 2007. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *J. Biol. Chem.* 282, 21259-21267.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Ulmer, A.J., Holst, O., Brade, H., Schmidt, G., Mamat, U., Grimmecke, H.D., Kusumoto, S., ., 1993. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* 187, 169-190.
- Roberts, J.A., Kaack, M.B., Baskin, G., Chapman, M.R., Hunstad, D.A., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J., 2004. Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein. *J. Urol.* 171, 1682-1685.
- Ronald, A., 2002. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Am. J. Med.* 113 Suppl 1A, 14S-19S.
- Saier, M.H., Jr., 2006. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J. Membr. Biol.* 214, 75-90.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Schembri, M.A., Klemm, P., 2001. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimh variants and ramifications for virulence. *Infect. Immun.* 69, 1322-1328.
- Schilling, J.D., Martin, S.M., Hunstad, D.A., Patel, K.P., Mulvey, M.A., Justice, S.S., Lorenz, R.G., Hultgren, S.J., 2003. CD14- and Toll-Like Receptor-Dependent Activation of Bladder Epithelial Cells by Lipopolysaccharide and Type 1 Piliated *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 1470-1480.
- Schilling, J.D., Mulvey, M.A., Vincent, C.D., Lorenz, R.G., Hultgren, S.J., 2001. Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J. Immunol.* 166, 1148-1155.
- Scholl, D., Adhya, S., Merrill, C., 2005. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4872-4874.
- Schroemm, A.B., Brandenburg, K., Loppnow, H., Moran, A.P., Koch, M.H., Rietschel, E.T., Seydel, U., 2000. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267, 2008-2013.

- Schubert, S., Norenberg, D., Clermont, O., Magistro, G., Wieser, A., Romann, E., Hoffmann, C., Weinert, K., Denamur, E., 2010. Prevalence and phylogenetic history of the TcpC virulence determinant in *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 429-434.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., Heesemann, J., 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* 66, 480-485.
- Schulman, H., Kennedy, E.P., 1977. Identification of UDP-glucose as an intermediate in the biosynthesis of the membrane-derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252, 6299-6303.
- Schwan, W.R., 2008. Flagella allow uropathogenic *Escherichia coli* ascension into murine kidneys. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 441-447.
- Selvaraj, S.K., Prasadaraio, N.V., 2005. *Escherichia coli* K1 inhibits proinflammatory cytokine induction in monocytes by preventing NF-kappaB activation. *J. Leukoc. Biol.* 78, 544-554.
- Sivick, K.E., Mobley, H.L., 2010. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect. Immun.* 78, 568-585.
- Sivick, K.E., Schaller, M.A., Smith, S.N., Mobley, H.L., 2010. The innate immune response to uropathogenic *Escherichia coli* involves IL-17A in a murine model of urinary tract infection. *J. Immunol.* 184, 2065-2075.
- Snyder, J.A., Haugen, B.J., Buckles, E.L., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Donnenberg, M.S., Welch, R.A., Mobley, H.L., 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect. Immun.* 72, 6373-6381.
- Spira, B., Ferreira, G.M., de Almeida, L.G., 2014. relA enhances the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS. One.* 9, e91703.
- Svanborg, E.C., Briles, D., Hagberg, L., McGhee, J., Michalec, S., 1984. Genetic factors in host resistance to urinary tract infection. *Infection* 12, 118-123.
- Tate, W.J., III, Douglas, H., Braude, A.I., Wells, W.W., 1966. Protection against lethality of *E. coli* endotoxin with "O" antiserum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 133, 746-762.
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V.K., Elizabeth, J., Rao, U.K., Ranganathan, K., 2012. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 16, 400-405.
- Thumbikat, P., Waltenbaugh, C., Schaeffer, A.J., Klumpp, D.J., 2006. Antigen-specific responses accelerate bacterial clearance in the bladder. *J. Immunol.* 176, 3080-3086.
- Torres, A.G., Payne, S.M., 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 23, 825-833.

- Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F., Cerami, A., 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 330, 662-664.
- Tsai, C.M., Frasch, C.E., 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119, 115-119.
- Van Dijk, W.C., Verbrugh, H.A., van der Tol, M.E., Peters, R., Verhoef, J., 1979. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infect. Immun.* 25, 603-609.
- Vines, E.D., Marolda, C.L., Balachandran, A., Valvano, M.A., 2005. Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress. *J. Bacteriol.* 187, 3359-3368.
- Wang, R.F., Kushner, S.R., 1991. Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 100, 195-199.
- Wang, X., Quinn, P.J., 2010. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog. Lipid Res.* 49, 97-107.
- Weissborn, A.C., Liu, Q., Rumley, M.K., Kennedy, E.P., 1994. UTP: alpha-D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *J. Bacteriol.* 176, 2611-2618.
- Whitfield, C., Roberts, I.S., 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31, 1307-1319.
- Wieser, A., Storz, E., Liegl, G., Peter, A., Pritsch, M., Shock, J., Wai, S.N., Schubert, S., 2014. Efficient quantification and characterization of bacterial outer membrane derived nanoparticles with flow cytometric analysis. *Int. J. Med. Microbiol.*
- Wijetunge, D.S., Karunathilake, K.H., Chaudhari, A., Katani, R., Dudley, E.G., Kapur, V., DebRoy, C., Kariyawasam, S., 2014. Complete nucleotide sequence of pRS218, a large virulence plasmid, that augments pathogenic potential of meningitis-associated *Escherichia coli* strain RS218. *BMC. Microbiol.* 14, 203.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 11-19.
- Wu, C., Lim, J.Y., Fuller, G.G., Cegelski, L., 2012. Quantitative analysis of amyloid-integrated biofilms formed by uropathogenic *Escherichia coli* at the air-liquid interface. *Biophys. J.* 103, 464-471.
- Wyckoff, T.J., Raetz, C.R., Jackman, J.E., 1998. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin. *Trends Microbiol.* 6, 154-159.
- Yamamoto, S., 2007. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Chemother.* 13, 68-73.

- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S., 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303, 1522-1526.
- Zhang, Y., Morar, M., Ealick, S.E., 2008. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 3699-3724.
- Zhou, G., Mo, W.J., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T.A., Glockshuber, R., Wu, X.R., Sun, T.T., Kong, X.P., 2001. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J. Cell Sci.* 114, 4095-4103.
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., Doyle, R.J., 1998. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 223-228.
- Zygmunt, M.S., Jacques, I., Bernardet, N., Cloeckert, A., 2012. Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1370-1373.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Oktober 2011 bis September 2015 am Max von Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Im Folgenden sei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlichst gedankt:

Mein Dank gilt zuerst meinem Doktorvater Prof. Dr. Rainer Haas und meinem Mentor Prof. Dr. Sören Schubert für die Zurverfügungstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien. Weiterhin möchte ich ihnen für die exzellente Betreuung der vorliegenden Arbeit und das Einbringen neuer Ideen ebenso wie ihrer konstruktiven Kritik herzlich danken.

Birgit Groß und Gabriele Liegl danke ich vor allem dafür, dass sie das Labor so wunderbar in Schuss gehalten haben und bei meinen Experimenten behilflich waren, wenn es nötig war. Außerdem wart ihr immer für eine gute Arbeitsatmosphäre wichtig!

Meinem Kollegen und mittlerweile gutem Freund Maxim Messerer danke ich für den Ideenaustausch und die gegenseitige Hilfe in den letzten Jahren. Ich bin froh, Dich in den Höhen und Tiefen dieser Doktorarbeit als Büro- und Benachbarn gehabt zu haben!

Dr. Andreas Wieser danke ich für das Einbringen zahlreicher Anregungen und der Hilfestellung bei methodischen Fragen, die mir halfen, diese Arbeit nach meinen Ideen umzusetzen.

Dr. Martin Arnold möchte ich dafür danken, dass er mich gerade am Anfang dieses Projekts stets unterstützt hat und mir dabei half im Labor gut Fuß zu fassen.

Christiane Hoffmann und Giuseppe Magistro danke ich für die Vorarbeiten und die Einarbeitung in das Projekt.

## Danksagung

---

Prof. Dr. Otto Holst danke ich für die Isolierung des hoch reinen LPS.

Annabell Peter sei für die Einführung und Hilfe bei der Produktion und Vermessung der Außenmembranvesikel bedankt.

Auch den Mitarbeitern der Diagnostik danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und insbesondere für die Mithilfe bei der materiellen Versorgung.

Ich möchte auch all den netten Menschen danken, die ich in meiner Zeit am Max von Pettenkofer-Institut kennen lernen durfte und die mir die Zeit erleichtert haben! Gerade die vielen Aktivitäten mit Euch werden mir in guter Erinnerung bleiben!

Meinem guten Freund Sebastian Lamprecht danke ich herzlich fürs Korrekturlesen und für die Aufmunterung in schweren Zeiten.

Meiner großen Stütze Katharina Miller möchte ich für die großartige Unterstützung außerhalb des Labors danken! Du warst immer für mich da, wenn ich Dich brauchte! Auch das Korrigieren dieser Arbeit war für Dich eine Selbstverständlichkeit! Danke!

Natürlich gilt mein größter Dank meiner Familie, die mich stets in allen Belangen unterstützt hat. Ohne Euch und euer Zutun wäre ich nicht so weit gekommen!

## **Eidesstattliche Versicherung**

**Meyer, Christian Karl**

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Charakterisierung von Einflussfaktoren auf die Suppression der *in vitro* Zytokin-Antwort durch uropathogene *Escherichia coli*.“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin/Doktorand